UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

TESIS DOCTORAL

Aplicación de la fisiología reproductiva y el metabolismo energético de la coneja como modelo animal en los sistemas de producción en cunicultura: equilibrio entre productividad, rendimiento y bienestar animal

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carlota Almudena Fernández- Pacheco Martorell

Directoras

Mª Pilar Millán Pastor
Mª Pilar García Rebollar

Madrid

© Carlota Almudena Fernández- Pacheco Martorell, 2023

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

TESIS DOCTORAL

APLICACIÓN DE LA FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA Y EL METABOLISMO ENERGÉTICO DE LA CONEJA COMO MODELO ANIMAL EN LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN CUNICULTURA: EQUILIBRIO ENTRE PRODUCTIVIDAD, RENDIMIENTO Y BIENESTAR ANIMAL.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Carlota Almudena Fernández- Pacheco Martorell

Directoras:

Dra. Mª Pilar Millán Pastor y Dra. Mª Pilar García Rebollar

Diseño de portada: Carlota Fernández-Pacheco, UCM.
Fotografía de portada: Pilar García Rebollar, UPM.
Dibujo de portada: Rocío Andújar, UCM.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Sección Departamental de Fisiología (Veterinaria)

APLICACIÓN DE LA FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA Y EL METABOLISMO ENERGÉTICO DE LA CONEJA COMO MODELO ANIMAL EN LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN CUNICULTURA: EQUILIBRIO ENTRE PRODUCTIVIDAD, RENDIMIENTO Y BIENESTAR ANIMAL.

Tesis Doctoral

Carlota Almudena Fernández- Pacheco Martorell

Madrid, 2023

Las Dras. **Mª Pilar Millán Pastor**, Profesora Contratada Doctora de Universidad de la Sección Departamental de Fisiología (Veterinaria) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y **Mª Pilar García Rebollar**, Catedrática del Departamento de Producción Agraria de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y Biosistemas de la Universidad Politécnica de Madrid, hacen constar:

Que la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada: "Aplicación de la fisiología reproductiva y el metabolismo energético de la coneja como modelo animal en los sistemas de producción en cunicultura: equilibrio entre productividad, rendimiento y bienestar animal", de la cual es autora la Licenciada en Veterinaria **Dª Carlota Almudena Fernández-Pacheco Martorell**, ha sido realizada bajo su dirección conjunta y que, tras su revisión, consideran que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Madrid, julio de 2023

Fdo: Mª Pilar Millán Pastor

Fdo: Mª Pilar García Rebollar

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias al Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad AGL2015-65572-C2-1-R y RTI2018-094404-B (MINECO/FEDER).

Todos los protocolos experimentales en los que se emplearon animales fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Politécnica de Madrid, y de la Universidad Complutense de Madrid como Órgano Habilitado de la Dirección General de Ganadería y Agricultura de la Comunidad de Madrid (PROEX 302/15).

"Inténtalo. Falla de nuevo. Falla mejor."-
Samuel Becket

AGRADECIMIENTOS

Es importante dar las gracias. La vida se conforma de etapas que se suceden una tras otra, y muchas veces no tenemos el poder de decidir dónde acaban unas y comienzan otras. Lo importante es que sí podemos elegir cómo entramos y salimos de ellas.
Esta etapa, que deja sentir su final mientras escribo estas líneas, ha sido larga y difícil, pero también, como les suele ocurrir a todos los que me han precedido en este momento vital, gratificante. Me ha planteado retos que no me imaginaba superando, momentos en los que pensé que era imposible dar más de mí misma... y que, sin embargo, después, han pasado a formar parte de mi historia como recuerdos en los que me demostré que mi capacidad supera mis propias expectativas. Y de ahí he aprendido la lección de confiar mucho más en mí.
Sin embargo, el camino nunca se recorre solo... y por eso, como decía al principio, es importante dar las gracias:

Gracias a **May y a Pilar**, porque después de todos estos años que se nos estaban haciendo eternos, hemos conseguido acabar el trabajo sin que el trabajo acabe con nosotras. Ha hecho falta mucha paciencia, mucho entendimiento y muchas ganas de que todo llegue a buen puerto, y menos mal que somos las tres igual de cabezotas y perseverantes (para lo bueno y lo no tan bueno, pero siempre con mucho cariño), porque por fin estamos aquí. Gracias **Pilar**, por ser la gran jefa que necesitábamos y gracias **May**, por la insistencia y por haber sido siempre como un ángel de la guarda en mi vida académica.

Gracias a mi **madre**, por creer siempre en mí. Por darme la razón cuando la tenía y ayudarme cuando estaba equivocada. Por preguntarme, por animarme y por recordarme que lo que se empieza, se acaba.
Gracias a mi **padre**, por leer mis artículos, aunque no entendiese muy bien de qué iba la cosa, por saber transmitirme siempre buen humor, por no dejar que me olvide de lo importante que soy y de las cosas que puedo hacer.
Gracias a mi **abuela**, que ya no está, pero sin ella y su cariño no sé de dónde habría sacado las fuerzas para terminar. Nunca he tenido ninguna duda de lo orgullosa que estaba de mí, pero espero que con esto, lo esté un poquito más desde el cielo.
Gracias a mi **hermano**, porque aunque a veces es complicado estar en el lugar adecuado y en el momento oportuno, nunca ha faltado y siempre ha estado ahí para hacerme reír y sentirme apoyada.

Gracias a mis amigos por todas las horas impagables de desahogo, de interés, de apoyo, de ánimos, de felicitaciones por los artículos, de noches de partidas que me ayudaban a desconectar, de preocupación por llegar a las fechas y que todo el esfuerzo tuviera su recompensa, por leerse conmigo 500 veces las instrucciones para que no hubiera lugar a dudas... **Vero, Carmen, Ali, Ro, David, Miguel, Borja, MJ, Diego...** vuestros nombres tenían que estar aquí.
Aquí una mención especial para mi amigo y doctor: **Pablo**. Por las crisis, los memes, las risas histéricas, las llamadas de teléfono aleatorias, las noches de sushi y el saborcito especial de la ansiedad que nos ayudó a dar el sprint final. Por cierto: alguien le debe una cena a alguien.

Gracias también a **Sarita** por otras cuantas horas de charlas, por convencerme siempre de seguir, por compartir su experiencia y su sabiduría cuando lo he necesitado. Y con ella, gracias a todo el departamento (**Juan Carlos, Gema, Alfredo, Carmen**...) por vuestro cariño, por ser otra pequeña familia y por desear siempre lo mejor para mí, incluso cuando me ha sido complicado estar presente.
También gracias a **María Rodríguez** y a **Bea**, porque aunque su participación podría pasar desapercibida, ha sido una de las más esenciales de esta tesis, ya que la granja, la recogida de muestras y las fotos han sido la base sobre la que se ha podido hacer todo esto. Habéis sido el claro ejemplo del "hoy por ti, mañana por mí".

No puedo olvidarme de darle las gracias a **Elisa**, por escucharme y reírse conmigo en los momentos más estresantes y por el compañerismo de sacar el trabajo adelante cuando mi tiempo no daba para más. Sin ti habría sido mucho más difícil. Y por supuesto, gracias a **Lorena**, que en otro momento y otra circunstancia, pero también ha sido un apoyo incondicional y sin el que probablemente me hubiera vuelto "cucú" del todo.

Por último, y tengo que decir que para mí, lo más importante: gracias, **Óscar.** La persona que casi puede decir que esta tesis es tanto suya como mía. Por las largas noches terminando gráficos y powerpoints, por prestarme mil veces el ordenador, por echar horas en el laboratorio cuando hizo falta, por ofrecerte siempre a cualquier pequeña cosa que me pudiera ayudar, por cubrirme en todas las responsabilidades que no he podido compartir porque mi tiempo estaba en esto... por todo, absolutamente todo. Porque me has acompañado y me has hecho reír y me has cuidado en los momentos más difíciles y porque por fin nos vamos a poder ir de vacaciones sin culpabilidad y sin pensar en todo lo que hay que recuperar a la vuelta. Por plantarte cada vez que he querido rendirme y por esa confianza y fe infinita que me tienes, ¡gracias!

Y a todos los que con poco o mucho me han animado los días más difíciles de esta carrera de fondo, y que seguramente me dejo en el tintero...

GRACIAS.

Las denominaciones que en esta memoria hacen referencia a personas y que figuren en género masculino o femenino, no se relacionan necesariamente con ningún género en particular.

RESUMEN DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE GRÁFICOS, IMÁGENES, TABLAS Y FIGURAS 1

GLOSARIO ALFABÉTICO DE ABREVIATURAS 4

RESUMEN 6

SUMMARY 11

1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 15

1.1 CUNICULTURA: SITUACIÓN ACTUAL. 16

1.2 IMPORTANCIA DE LA NUTRICIÓN MATERNA EN PRODUCCIÓN Y BIENESTAR 20

1.3 DESARROLLO FETOPLACENTARIO DEL CONEJO 25

1.4 METABOLISMO ENERGÉTICO 30

1.4.1 Hormonas tiroideas: tiroxina y triyodotironina. 30

1.4.2 Glúcidos: glucosa, insulina e índice HOMA-IR. 32

1.4.3 Lípidos: colesterol, triglicéridos y ácidos grasos no esterificados. 35

1.5 GLUCOCORTICOIDES: CORTISOL vs. CORTICOSTERONA 39

1.6 ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN 41

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS 44

3. EXPERIMENTO 1: ESTUDIO DEL EFECTO DEL TAMAÑO DE CAMADA SOBRE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE LAS HORMONAS HIPOFISARIAS Y OVÁRICAS DE CONEJAS PRIMÍPARAS DURANTE LA LACTACIÓN. 47

1. INTRODUCCIÓN 48

2. MATERIAL Y MÉTODOS 50

3. RESULTADOS 55

4. DISCUSIÓN 57

5. CONCLUSIONES 59

4. EXPERIMENTO 2: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE DIFERENTES PAUTAS DE RESTRICCIÓN MODERADA DE ALIMENTO DURANTE LA GESTACIÓN DE HEMBRAS PRIMÍPARAS EN LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA A LARGO PLAZO, EL RENDIMIENTO PRODUCTIVO Y BIENESTAR. 60

1. INTRODUCCIÓN 61

2. MATERIAL Y MÉTODOS 63

3. RESULTADOS 70

4. DISCUSIÓN 79

5. CONCLUSIONES 87

5. DISCUSIÓN GENERAL 88

6. CONCLUSIONES GENERALES 92
7. BIBLIOGRAFÍA Y LITERATURA CITADA 94
ANEXO I: PONENCIAS EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES 113
ANEXO II: PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL 115

ÍNDICE DE GRÁFICOS, IMÁGENES, TABLAS Y FIGURAS

GRÁFICOS

Gráfico 1. Evolución del precio de las materias primas empleadas en alimentación animal – Mercolleida, 2022.

Gráficos 2 y 3: (2) Ruta metabólica de la respuesta fisiológica al estrés. The Farm Animal Welfare Fact Sheet, abril 2013. Farm Animal Welfare Education Centre, Barcelona, España. **(3)** Diagrama de regulación del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal. (CRF, factor liberador de corticotropina; ACTH, hormona adrenocorticotrópica). The Weston A. Price Foundation, 2018.

Gráfico 4: Tabla ilustrativa de los tiempos de implantación en diversas especies. Fuente: López Tello, J. UPM, 2016.

IMÁGENES

Imagen 1: Placentación del conejo. Ramsey, 1982.

Imagen 2: Implantación embrionaria del conejo. Enders y Schafle, 1971.

Imagen 3: Toma de muestras de la arteria central de la oreja en tubo con EDTA como antigoagulante. Fuente: Rodríguez M, UPM. 2016.

Imágenes 4 A-B: (A) Nidificación. **(B)** Gazapos recién nacidos. Fuente: Rebollar PG, Rodríguez M. UPM. 2016

Imágenes 5 A-B: Gazapos de 2 semanas antes y después de ser amamantados. Fuente: Fernández-Pacheco, C. UCM. 2016.

Imagen 7: Gazapos al deteste. Fuente: Fernández-Pacheco, C. UCM. 2016.

Imágenes 8 A-B: Pesajes de camadas a diferentes días de lactación. Fuente: Rebollar, UPM; Fernández-Pacheco, C. UCM. 2016

Imagen 7: Útero de coneja grávido. Fuente: Rodríguez M, Rebollar PG- UPM. 2016.

Imagen 9: Placenta a día 28 de gestación, determinación del diámetro de la placenta fetal (laberinto). Fuente: Rodríguez M, Rebollar PG- UPM. 2016.

Imagen 10: Feto de conejo y envolturas placentarias (amnios, alantoides y vellosidad coriónica) a día 28 de gestación. Fuente: Rodríguez M, Rebollar PG- UPM. 2016.

Imágenes 11 A-H: Medidas de biometría de fetos a 28 días de gestación. **(A)** Longitud total (LON); **(B)** Diámetro Biparietal (BPD); **(C)** Distancia Occipito-Nasal (ONL); **(D)** Diámetro torácico (TD). Fuente: Rodríguez M, Rebollar PG. UPM. 2017.

Imágenes 12 A-C: Medidas de la placenta a día 28 de gestación. **(A)** Longitud de la placenta materna o decidua; **(B)** Grosor de la decidua; **(C)** Longitud de la placenta materna (laberinto). Fuente: Rebollar PG, Rodríguez M. UPM. 2016.

FIGURAS

Figura 1: Diseño experimental, experimento 1. Cronograma de toma de muestras.

Figura 2: Concentraciones plasmáticas de prolactina (PRL) antes (A) y después (D) del amamantamiento de conejas primíparas lactantes con alta densidad de camada (HL, 10-12 gazapos; n=6) y baja densidad de camada (LL, 7-9 gazapos; n= 6). IA: Inseminación Artificial; dpd= días post-destete. ***: P=0.0003.

Figura 3: (A) Hormona luteinizante (LH) y **(B)** progesterona (P4) plasmáticas 0 y 60 min después de la IA de conejas con 10-12 gazapos (HL; n=6) y con 7-9 gazapos (LL; n=6) en su primera lactación. Las letras a, b indican diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos 0 y 60' (P<0.05). HL: alta densidad de camada (10-12 gazapos). LL: baja densidad de camada (7-9 gazapos).

Figura 4: Diseño experimental, experimento 2. Cronograma de RAM, toma de muestras y análisis productivo y hormonal.

Figura 5: Evolución del consumo diario de pienso (g/día) en conejas gestantes alimentadas *ad libitum* (Control), restringidas al 60% de su ración durante 1 semana desde el día 0 al 7 de gestación (R07), 2 semanas desde el día 7 al 21 (R721) y 3 semanas desde el día 0 al 21 de gestación (R021). Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales (p<0,0001).

Figuras 6A-H: Efecto de la Restricción de Alimento Materna y el tiempo en **(A)** las concentraciones plasmáticas de triiodotironina (T3); **(B)** insulina; **(C)** NEFA; **(D)** HOMA-IR; **(E)** triglicéridos; **(F)** colesterol en conejas gestantes alimentadas *ad libitum* (Control), restringidas al 60% de su ración durante 1 semana desde el día 0 al 7 de gestación (R07), 2 semanas desde el día 7 al 21 (R721) y 3 semanas desde el día 0 al 21 de gestación (R021). Las figuras 6**G** y 6**H** representan los valores de concentraciones plasmáticas de triglicéridos y colesterol durante la fase de lactación, respectivamente. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales (p<0,05). Cada barra de los días 14, 21 y 28 de gestación muestra la media de 5 animales, y en el día 0 la de 10 animales. La línea discontinua de la figura 6D representa el valor por encima del cual el HOMA-IR indica la presencia de resistencia a la insulina.

TABLAS

Tabla 1. Rendimiento productivo (media ± SEM) en el segundo ciclo de conejas con densidad de camada alta (HL: 10-12 gazapos) y densidad de camada baja (LL: 7-9 gazapos) durante su primera lactación e inseminadas tras el destete.

Tabla 2. Número y parámetros biométricos de fetos de 28 días de gestación en conejas alimentadas *ad libitum* (Control), restringidas al 60% de su ración durante 1 semana desde el día 0 al 7 de gestación (R07), 2 semanas desde el día 7 al 21 (R721) y 3 semanas desde el día 0 al 21 de gestación (R021).

Tabla 3. Peso y dimensiones de las placentas de hembras gestantes a día 28 de gestación, alimentadas *ad libitum* (Control), restringidas al 60% de su ración durante 1 semana desde el día 0 al 7 de gestación (R07), 2 semanas desde el día 7 al 21 (R721) y 3 semanas desde el día 0 al 21 de gestación (R021).

Tabla 4. Parámetros productivos de conejas alimentadas *ad libitum* (Control), restringidas al 60% de su ración durante 1 semana desde el día 0 al 7 de gestación (R07), 2 semanas desde el día 7 al 21 (R721) y 3 semanas desde el día 0 al 21 de gestación (R021) en su segundo ciclo.

Tabla 5. Efecto de una Restricción de Alimento Materna (RAM) y del tiempo sobre los parámetros endocrinos y metabólicos en conejas alimentadas *ad libitum* (Control), restringidas al 60% de su ración durante 1 semana desde el día 0 al 7 de gestación (R07), 2 semanas desde el día 7 al 21 (R721) y 3 semanas desde el día 0 al 21 de gestación (R021).

Tabla 6. Efecto de la Restricción de Alimento Materna (RAM) y el tiempo sobre los parámetros endocrinos y metabólicos en lactación de conejas alimentadas *ad libitum* (Control), restringidas al 60% de su ración durante 1 semana desde el día 0 al 7 de gestación (R07), 2 semanas desde el día 7 al 21 (R721) y 3 semanas desde el día 0 al 21 de gestación (R021).

GLOSARIO ALFABÉTICO DE ABREVIATURAS

ACTH: Hormona liberadora de corticotropina (Adrenocorticotropic Hormone).

CC: Condición corporal

CHO: Colesterol (Cholesterol).

CL: Cuerpo lúteo.

CRF: Factor liberador de Corticotropina (Corticotropin Releasing Factor).

CTC: Corticosterona.

dpd: Días post-destete

dpp: Días post-parto.

E_2: Estradiol.

ED: Energía digestible.

EHHA: Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal.

EIA: enzimoinmunoanálisis

FND: Fibra no digestible.

FSH: Hormona folículoestimulante (Folicle Stimulating Hormone).

GB: Grasa bruta.

GLU: Glucosa.

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas (Gonadotropin Releasing Hormone).

HL: Alta densidad de camada (High Litter).

HOMA-IR: Modelo de evaluación de la resistencia a la insulina (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance).

IA: Inseminación Artificial.

IN: Insulina.

LH: Hormona Luteinizante (Luteinising Hormone).

LL: Baja densidad de camada (Low Litter).

LW: Peso de la camada (Litter Weight).

MFR: Maternal Food Restriction.

NEFA: Ácidos grasos no esterificados (Non-Esterified Fatty Acids).

P_4: Progesterona.

PC: Proteína concentrada.

pp: post-parto

PRL: Prolactina

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados (Poliinsaturated Fatty Acids)

PV: Peso vivo.

RAM: Restricción de Alimento Materna.

TO: Tasa de ovulación.

SAM: reacción Simpático-Adreno-Medular

T_3: Triyodotironina libre

T_4: Tiroxina libre

TBG: Globulina fijadora de tiroxina

TC: Tamaño de camada.

TG: Triglicéridos.

RESUMEN

Los objetivos actuales de la investigación en cunicultura son el perfeccionamiento de las líneas genéticas de alta prolificidad, la estandarización del manejo, la consecución de alimentos suplementados de la máxima calidad y la mejora del rendimiento en lo relativo a los costes de producción. Para ello, se emplea la selección genética a través del registro de los índices productivos y caracteres reproductivos para continuar las líneas con los mejores reproductores, y cada día se estudian nuevos compuestos como suplementos alimentarios y sus posibles beneficios tanto a nivel nutricional para el animal como para elevar la calidad del producto final, así como diversas estrategias de manejo tanto reproductivo como nutricional para lograr el máximo rendimiento de las explotaciones.

Debido al creciente interés del público general y de los consumidores por el bienestar animal, una línea de investigación en auge, es el estudio más en profundidad de los eventos fisiológicos y metabólicos que ocurren al aplicar diferentes estrategias de manejo y alimentación en los sistemas de producción, con el fin de conocer y evaluar el balance coste-beneficio de llevar a cabo estas acciones sobre los animales. Estos hallazgos permiten obtener una información mucho más detallada de los procesos metabólicos que influyen en la consecución de los objetivos productivos y aportan resultados que pueden correlacionarse con el buen estado sanitario, fisiológico e incluso psicológico de los animales, siendo esta una herramienta para respaldar las prácticas que se realizan en las granjas, ya que el bienestar animal se considera prioritario sobre otras cuestiones.

La línea de trabajo que ha seguido nuestro grupo de investigación en los últimos años, se ha enfocado principalmente en los efectos de suplementación de las dietas con ácidos grasos poliinsaturados (PUFA; Rodríguez *et al.*, 2017; 2018) de las hembras de líneas de elevada prolificidad sobre el perfil lipídico de la canal, mostrando que las canales obtenidas de animales alimentados con el pienso suplementado poseían un perfil lipídico más saludable que las alimentadas con los piensos comerciales habituales. También se han estudiado los efectos de estas dietas suplementadas sobre la regulación del metabolismo, la expresión génica, la actividad ovárica y numerosos procesos fisiológicos relacionados directa o indirectamente con la reproducción (Arias-Álvarez *et al.*,2009; García-García *et al,* 2021a; 2021b). Progresivamente, se han estudiado los efectos de una ración de alimento controlada en contraposición a una alimentación *ad libitum* sobre la homeostasis energética de las madres durante la gestación, y sus efectos sobre el rendimiento productivo y el estado sanitario a largo plazo de la descendencia de estas hembras sobre las que se aplica una restricción de alimento.

El primer objetivo específico fue, teniendo en cuenta el interés de la industria en obtener el máximo número de gazapos destetados por hembra, evaluar los efectos del tamaño de camada sobre la respuesta hipofisaria en líneas ya preseleccionadas por su elevada prolificidad, así como las posibles consecuencias a medio plazo sobre los siguientes ciclos productivos en el caso de las hembras primíparas, cuya condición es muy particular debido a la precocidad de esta especie y decisiva dentro del sistema de producción. La selección genética en las granjas comerciales ha potenciado estas líneas hiperprolíficas para lograr un mayor número de gazapos lactantes y un mayor número de destetes. Es frecuente realizar ajustes del tamaño de camada en 7-12 gazapos por hembra, incluso en las primíparas, a pesar de que se conoce que estas hembras requieren de un balance energético muy específico debido a la necesidad de satisfacer los requisitos de preñez, lactancia y crecimiento. El estímulo de succión de estos gazapos provoca la secreción de prolactina (PRL), que puede actuar como modulador de la liberación preovulatoria de hormona luteinizante (LH) y, por lo tanto, afectar la respuesta ovulatoria y productiva de las conejas.

En el primer experimento, la finalidad fue determinar si una elevada densidad de camada (grupo HL; 10-12 gazapos; n= 21) frente a una baja densidad de la misma (grupo LL; 7-9 gazapos; n=29), influye en las concentraciones plasmáticas de PRL. Se tomaron muestras de sangre de hembras en lactación con frecuencia semanal, empezando en el día 4 post-parto (pp) y hasta el día 32pp, tanto antes como después del amamantamiento de la camada. Después del destete, se llevó a cabo una nueva inseminación artificial (IA) para tomar una muestra de sangre a los 0 y 60 minutos tras la inducción de la ovulación, para determinar si el tamaño de la camada podría tener algún efecto sobre el pico de hormona luteinizante (LH), los niveles plasmáticos de progesterona (P_4) y los principales parámetros productivos de la segunda gestación. Todos los parámetros metabólicos y endocrinos se determinaron mediante enzimoinmunoanálisis (EIA) en laboratorio. El análisis estadístico mostró que las concentraciones plasmáticas de PRL derivadas del estímulo de succión de camadas de elevada densidad y camadas de baja densidad no reflejan diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales, a excepción de un aumento de las concentraciones de PRL después del destete en ambos grupos. Esto pudo deberse a que los tiempos de muestreo solamente permitieron determinar concentraciones todavía basales de PRL, haciendo necesarios intervalos de muestreo con mayor distancia entre sí para valorar correctamente si existen o no diferencias debidas al tamaño de camada. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en materia de niveles de LH y P_4 tras la IA, ni en el rendimiento productivo en la segunda gestación. Como conclusión, estos resultados sugieren que un rango de camada de 7 a 12 gazapos garantiza un estímulo de succión suficiente para mantener una adecuada respuesta hipofisaria y ovárica, así como un rendimiento productivo satisfactorio en la segunda gestación si la IA se realiza después del destete.

En el segundo experimento, el objetivo fue identificar las consecuencias de una moderada Restricción de Alimento Materna (RAM; 105g/d) aplicada en diferentes intervalos de la gestación de conejas primíparas, sobre el desarrollo feto-placentario de las camadas, la homeostasis energética de las madres en términos de concentraciones plasmáticas de triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4) libres, glucosa (GLU), insulina (IN), índice HOMA IR (modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina), ácidos grasos no esterificados (NEFA), niveles de colesterol (CHO) y triglicéridos (TG) en sangre y concentraciones plasmáticas de corticosterona (CTC) como indicador metabólico de estrés. Los grupos experimentales se sometieron a la RAM desde el día de la IA hasta el día 7 de gestación (1 semana, R07; n=96), desde el día 7 al 21 de gestación (2 semanas, R721; n=92) o desde el día de la IA hasta el día 21 de gestación (3 semanas, R021; n=94), siendo el grupo Control (n=92) aquel que se alimentó *ad libitum* durante las 4 semanas de gestación. Todos los parámetros se determinaron aleatoriamente en 5 hembras por grupo, en 3 momentos de la gestación (Días 0, 14 y 21) y en 4 momentos de la lactación (Días 7, 14, 21 y 30) mediante EIA y el día 28 de gestación, se sacrificaron aleatoriamente 11 hembras de cada grupo para evaluar el desarrollo fetoplacentario, dejando el resto de hembras hasta el final de la gestación para poder evaluar el rendimiento productivo.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el software estadístico SAS, empleando la coneja como unidad experimental. Para analizar los datos de consumo se usó un ANOVA, teniendo en cuenta la ración de comida como efecto principal, y el efecto de la RAM se analizó mediante un análisis de medidas repetidas con el tratamiento (RAM), el tiempo, y la interacción entre ambos como efectos principales.

Tras la desaparición de la RAM, todos los grupos experimentales aumentaron su consumo voluntario de alimento, y cuanto mayor duración tuvo la RAM, menor fue el peso y tamaño de los fetos, pero no se observaron efectos a largo plazo sobre el desarrollo de las camadas en fase de cebo. Durante la gestación, el grupo R021 presentó las concentraciones más bajas de T_3 y las más elevadas de NEFA, mostrando cierta resistencia a la insulina hacia el final de la gestación, que se recuperó sin consecuencias a largo plazo en el periodo de lactación. A pesar de que los datos no revelaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos durante la gestación, se observó una tendencia ($p=0,0591$) entre el grupo Control y R021 en lo relacionado a los niveles de colesterol, sugiriendo que una RAM más prolongada sí hubiera mostrado efectos potencialmente negativos. Los niveles de TG circulantes en sangre también mostraron diferencias únicamente en el tiempo, reflejando la homeostasis energética de la movilización de reservas corporales de las hembras de todos los grupos, siendo mayores en los aquellos grupos donde la RAM tuvo mayor duración.

En el periodo de lactación, la homeostasis energética fue similar en todos los grupos, y en general, la RAM no afectó a las concentraciones de CTC en ningún momento del experimento. Cabe destacar el comportamiento de los TG, que presentaron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo. Hacia el final de la lactación, sus niveles circulantes en las hembras no gestantes de los grupos R721 y R021 fueron notablemente

menores que los de los otros dos grupos, siendo esto indicativo de que los TG aportados en la dieta estaban siendo empleados, no para el mantenimiento de una nueva gestación, sino para la recuperación de las reservas corporales de la madre. Como conclusión, se podría afirmar que la RAM aplicada afectó ligeramente al metabolismo y balance energético de los animales, pero que su estado metabólico, rendimiento productivo y bienestar general no se vieron afectados a largo plazo.

Como conclusiones generales, se puede decir que las conejas de líneas genéticamente seleccionadas por su elevada prolificidad, en condiciones comerciales, mantienen una adecuada secreción de PRL, LH y P4 en un amplio rango de tamaños de camada (entre 7 y 12 gazapos), sin que se observen efectos negativos en su rendimiento y bienestar en ciclos subsiguientes. Además, los regímenes de control de la ración tienen efecto sobre ciertos parámetros de biometría fetal y eficiencia placentaria en determinadas ventanas de la gestación, pero sin suponer un perjuicio para el rendimiento productivo ni para el desarrollo posterior de los gazapos en fase de cebo. Por último, los tamaños de camada estudiados en el experimento 1 y el control de ración aplicado en el experimento 2 no implicaron alteraciones significativas en la evaluación metabólica del bienestar animal mediante concentraciones plasmáticas de corticosterona, además de suponer un ahorro en los costes de producción.

SUMMARY

Current goals in rabbit production are perfectioning of high prolificacy genetic rabbit lines, standarization of reproductive management, achievement of high quality supplemented diets and improvement of production costs performance. Hence, genetic selection through productive perfomance records and selection of ideal reproductive characteristics to continue breeding with the best individuals are key to achieve this goals. Moreover, the study of new dietary additives to prove their potencial benefits regarding animal nutrition and improving the cascass quality also involves a wide field of research, as well a variety of management strategies both reproductive and nutritional to obtain the maximum productive output in farms.

Due to the increasing interest and concern of general population in matters of Animal Welfare, a growing field of research is a deeper knowledge of physiological and metabolic events that occur when applying these management and feeding strategies in production systems, in order to evaluate the potential risks of carrying out these actions on livestock animals. These findings allow a much detailed knowledge regarding the metabolic routes that influence the accomplishment of production goals, and offer information that can be correlated to an appropiate health, physiological and even psychological status of the animals. Thus, these strategies could be considered a suitable practice to support the current actions being carried out in farms, since Animal Welfare is considered to be a priority among other issues.

In previous works, our group has focused on the study of the effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids (PUFA; Rodríguez et al.,2017; 2018) of highly prolific does, in order to evaluate its improvement on carcass' lipidic profile, showing that animals fed with these supplemented diets delivered healthier and more desirable lipidic profile of meat than animals fed with commercial non-supplemented diets. Further, research has been conducted to assess the effects of these supplemented diets on metabolic regulation, gene expression, ovarian activity and a large number of physiological processes directly or indirectly related to reproduction (Arias-Álvarez et al., 2009; García-García et al., 2021a; 2021b). Forth, feed restriction has been tested as opposed to *ad libitum* feeding to observe the effects on energy balance of does during pregnancy, as well as its effects on productive performance and health status of the offspring in the long-term.

Considering the main goal of the rabbit meat industry is to obtain the greater number of weaned kits per doe, the first aim of our current work was to determine the effect of litter size of highly prolific rabbit does on their pituitary response in rabbit lines specifically selected for their high productive performance. Moreover, litter size of primiparous does could have consequences on subsequent pregancies, due to the particular reproductive nature and precocity of this species, which is essential regarding the outcome of production systems. Genetic selection in rabbit farms has enhanced these hyperprolific lines to achieve agreater number

of both lactating and weaned kits. Hence, it is frequent even in primiparous does to perform litter size adjustments to 7-12 kits per doe, although it is known that primiparous rabbit does require a very specific energy balance to endure lactation and further pregnancies, since their own growth has not been completed yet. Suckling stimulus of kits triggers prolactin (PRL) release, which can act as a modulator of the preovulatory release of luteinizing hormone (LH) and, therefore, the ovulatory and productive response of does.

In our first experiment, the main purpose was to assess if different litter sizes could affect PRL release and plasma concentrations. To this end, does were allocated in two experimental groups, one with high density litters (HL; 10-12 kits; n=21) and another with low density litters (LL; 7-9 kits, n=29) and blood samples were collected weekly, beginning on day 4 postpartum until day 32 postpartum, both before and after suckling. After weaning, a second artificial insemination (AI) was performed, taking blood samples both at 0 and 60 minutes after ovulation induction, to determine if litter size afected the preovulatory peak of luteinizing hormone (LH) and progesterone (P_4) plasma concentrations, or productive performance of second gestation. All blood parameters were tested by laboratory immunoassay. Statistiscal analysis of the data revealed no significant diferences in PRL plasma concentrations induced by suckling stimulus between groups, except for an increase in PRL concentrations right after weaning. This may be due to and insufficient time lapse between blood samplings. In addition, no differences between groups were found regarding LH and P_4 plasma concentrations, nor productive performance in the second pregnancy. In conclusion, these results suggest that a litter range of 7-12 kits induces an adequate suckling stimulus to maintain an optimum pituitary response, as well as a satisfactory productive perfomance in the second gestation when IA is performed after weaning.

In our second experiment, the aim was to identify the potencial consequences of a moderate Maternal Feed Restriction (MFR; 105d/day) applied during gestation of pimiparous rabbit does, on fetal growth, litter development and energy balance of the does. To this end, the parameters assessed were plasma concentrations of free triiodothyronine (T_3) and tiroxine (T_4), glucose (GLU), insulin (IN), the HOMA-IR index (homeostatic model assessment for insulin resistance), non esterified fatty acids (NEFA), cholesterol (CHO), triglycerids (TG), and finally, corticosterone (CTC) as a metabolic stress indicator. The experimental groups were subjected to MFR from AI to day 7 of gestation (1 week; R07; n=96), from day 7 to day 21 of gestation (2 weeks; R721; n=92), from AI to day 21 of gestation (3 weeks; R021; n=94), or were fed *ad libitum* during all 4 weeks of gestation (Control; n=92). All parameters were analysed in 5 random does per group 3 times during gestation (AI, Day 7 and Day 21) and 4 times during lactation (Day 7, Day 14, Day 21 and Day 30) using laboratory immunoassays. On day 28 of gestation, 11 random does of each group were euthanised to evaluate fetoplacental development, leaving the remaining does to the end of study to analyze their productive performance and development of the kits.

Statistical analysis was performed using SAS Software, being the rabbit doe the experimental unit. An ANOVA test was used to study the data regarding feed intake taking the duration of MFR as the main effect. The effect of MFR was analyzed using a repeated measures test using the treatment (MFR), time and interaction between them as the main effects.

When MFR ended, all experimental groups showed a remarkable rise in their voluntary feed consumption, and the longer the MFR lasted, the lower the weight and lenght of the kits were, but no adverse effects were observed in the long-term in the kits development during rearing. During gestation, group R021 showed the lowest plasma concentrations of T_3 the higher plasma concentrations of NEFA, also manifesting some insulin resistance by the end of pregnancy, which fully recovered its basal levels during lactation period. Although data did not retrieve significant statistical differences between experimental groups, a tendency to differ was observed ($p=0.0591$) regarding Control and R021 in means of cholesterol plasma concentrations. This suggest that a longer MFR could have negatively impacted on the does. Triglycerid plasma concentrations also showed significant differences over time, illustrating the energy homeostasis of body fat reserves of the does in all experimental groups, being higher those of the dams whose MFR lasted the longest.

During lactation, energy homeostasis of the mother was similar in all experimental groups, and MFR had no effect on the plasma concentrations of CTC at all. However, it is to be noted that TG showed significant differences over time. By the end of lactation, TG plasma concentrations in non-pregnant does of groups R721 and R021 where noticeably lower than those of Control and R07 groups, indicating that TG provided by feed intake was being used not for pregnancy maintenance, but to recover the body fat reserves of the dams. In conclusion, MFR applied in this experiment did slightly affect metabolism and energy balance of the does, but their metabolic status, productive performance and general welfare were not compromised in the long-term.

General conclusions are that female rabbits from lines genetically selected for their high prolificacy, under commercial conditions, maintain an adequate secretion of PRL, LH and P_4 in a wide range of litter sizes (between 7 and 12 young rabbits), without negative impact on their performance and welfare observed in subsequent productive cycles. In addition, ration control regimes have an effect on certain parameters of fetal biometry and placental efficiency at specific times of gestation, but without detrimental to productive performance or to the subsequent development of kits during rearing. Finally, the litter sizes studied in experiment 1 and the ration control applied in experiment 2 did not imply significant alterations in the metabolic evaluation of animal welfare through plasma corticosterone concentrations, in addition to saving production costs.

1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 CUNICULTURA: SITUACIÓN ACTUAL.

La Producción Animal se basa en dos momentos clave del ciclo reproductivo: la gestación y la lactación. Sobre ellas se construye todo el sistema de reproducción animal sobre el que depende un sector completo de la economía que tiene su origen en el neolítico, hace 10.000 años, con la transformación de las sociedades humanas cazadoras-recolectoras en sociedades sedentarias.

La intensificación de la selección genética, el conocimiento de los procesos de digestión de cada especie, el estudio de la digestibilidad de los forrajes y concentrados, la composición y valor nutricional de los productos de la agricultura, la conservación y procesos técnicos para aumentar la durabilidad de los alimentos destinados a animales, así como el desarrollo de controles de calidad tanto para los alimentos como para el producto final, han convertido el sector en uno de los más innovadores y eficientes de la industria. La elevada competitividad del mercado en cuanto a los beneficios reportados por otras secciones del a industria cárnica, ha derivado en el perfeccionamiento no solo de técnicas de manejo, sino de aprovechamiento de recursos y conocimientos para mantener la cunicultura en el mercado ganadero.

Por otro lado, el conejo sigue siendo una especie muy empleada en investigación básica y traslacional en la actualidad, representando entre el 2019 y el 2021 alrededor del 2,52% del total de animales empleados en investigación (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021). Esto hace que la especie tenga un interés no sólo económico por su utilización para refinar e innovar en el ámbito de su utilización reglamentaria y producción rutinaria, sino también social, debido a su potencial como modelo animal que permite ahondar en el conocimiento de desórdenes médicos y metabólicos que afectan a un porcentaje notable de la población mundial. Ambos usos están contemplados en la legislación actual en esta materia (RD 53/2013).

Aun así, dado que existen modelos animales más específicos para la medicina traslacional, el principal impacto de la especie sigue residiendo en el sector ganadero.

A lo largo del tiempo, la productividad de las granjas cunícolas ha ido en aumento y se ha homogeneizado mediante la implementación de buenas prácticas zootécnicas y de manejo, como son el trabajo por lotes, la inseminación artificial (IA) (Rebollar *et al.*, 1994), y la aplicación de ritmos productivos adecuados (Arias-Álvarez *et al.*, 2009), siendo la optimización del rendimiento productivo el principal factor que asegura una alta productividad en las granjas. Esto implica que el sector deba estar en constante evolución para la introducción de nuevas estrategias que tengan en cuenta la fisiología, el comportamiento reproductivo y el bienestar de los animales para poder mantener estos elevados estándares (Mattioli *et al.*, 2021).

El tamaño de camada medio en la producción de carne de conejo varía dependiendo de diversos factores: la selección genética, la nutrición y las prácticas de manejo reproductivo. Algunos estudios (Xiao, 2000; Omar *et* al., 2022) señalan un tamaño de camada medio de 8 gazapos por hembra reproductora, mientras que otros estudios (Xi, 2011; Zapletal, 2021) se han centrado en los factores que pueden afectar a este tamaño de camada, como son los suplementos alimentarios, los efectos de la selección genética y el cruce entre líneas, y el índice de crecimiento de los gazapos lactantes como indicador genético del rendimiento productivo potencial.

El tamaño de camada (TC) es el principal indicador de un rendimiento productivo adecuado que permita la continuidad del sistema de producción, por lo que este parámetro es determinante en la producción cunícola. Existen estudios que muestran una correlación negativa entre el TC y el índice de conversión (IC) de las camadas (Omar et al., 2022), por lo que la búsqueda de un equilibrio entre el tamaño de camada y el rendimiento productivo de los gazapos en la fase de cebo es clave para conseguir los objetivos en las explotaciones.

Gracias a los avances en selección genética y homogeneización en las estrategias de manejo, como la inseminación artificial (IA) y el establecimiento de lotes en los sistemas de producción (Maertens, 1995; Castellini et al., 2010), la productividad media del sector se ha optimizado prácticamente al máximo de su capacidad. Sin embargo, la intensificación de la producción puede conllevar el aumento en la tasa de mortalidad tanto por enfermedad como por agotamiento reproductivo, o una reducción en la tasa de fertilidad que implica el sacrificio de las hembras incapaces de quedar gestantes. Esto deriva en que, en la actualidad, la tasa de reposición de las granjas cunícolas se sitúe entre el 80 y el 150% al año (Mondin et al., 2021), con una media de 4,7 camadas por hembra a lo largo de su vida reproductiva. El aumento de la tasa de reposición tiene un efecto directo sobre los costes variables de las explotaciones, por lo que alargar la vida reproductiva de las madres es una prioridad en el sector a día de hoy, dado que las mejoras en el manejo reproductivo impactan directamente en el bienestar animal y en los beneficios de la práctica ganadera.

Además, la búsqueda del máximo rendimiento y la elevada capacidad reproductiva que ha demostrado la especie, ha convertido en una práctica frecuente realizar la IA durante la lactación de la camada previa (González-Mariscal et al., 2007; Theau-Clement, 2010). Al iniciar su vida reproductiva de manera temprana, en muchas ocasiones las hembras destinadas como reproductoras aún no han completado su desarrollo, por lo que su condición corporal (CC) y reservas grasas pueden ser insuficientes para enfrentar los sucesivos ciclos (Rebollar et al., 2009; Augustine *et al.*, 2008). Esto concuerda también con los resultados de Martínez-Goméz

et al. (2004), donde las hembras duplicaron su consumo de alimento durante la lactación y a pesar de ello mantuvieron un peso corporal similar al del inicio del experimento, lo cual sugiere que en animales jóvenes y con bajas reservas de grasa, las reservas corporales no se recuperan debidamente mientras tienen camadas lactantes.

En el ser humano, se ha demostrado que la simultaneidad de la lactación y el final de la gestación se ha asociado con una reducción en el consumo de leche y un menor crecimiento infantil (Marquís et al., 2003), por lo que evitar la superposición de la segunda gestación y la primera lactación en conejas primíparas es recomendable para mantener la tasa de fertilidad en niveles adecuados (Sakr et al., 2012). Además, dado que la simultaneidad de procesos tan demandantes a nivel energético como la gestación y la lactación aumentan las necesidades alimentarias de energía y proteína en la dieta de las conejas (Parigi- Bini et al., 2010), permitir la recuperación de reservas corporales retrasando la IA evita el agotamiento metabólico de los animales, reduciendo la eliminación de hembras por baja fertilidad y protegiendo el bienestar animal.

La condición corporal de esos animales, por tanto, puede tener un gran impacto en el rendimiento productivo de la granja. Algunos estudios (Bonanno et al., 2008) sugieren que la CC se relaciona directamente con la respuesta reproductiva y la productividad de las conejas lactantes. La CC también se relaciona con las reservas energéticas en forma de depósitos de grasa, lo cual a su vez tiene un efecto sobre el tamaño y el peso de las camadas, además de la producción y composición de la leche (Agea et al., 2020). Por lo tanto, es importante evitar la reproducción de hembras con una CC inadecuada o tamaños de camada demasiado elevados, dado que ambas situaciones podrían afectar, no sólo al rendimiento productivo de los animales, sino también a su bienestar (Arias-Álvarez et al., 2009).

En los últimos años el sector de la cunicultura ha experimentado una concentración de la producción, reduciéndose el número de explotaciones en activo. Esto responde a una globalización de la economía que exige una mayor profesionalización de la actividad, haciendo que las explotaciones pequeñas y familiares encuentren ciertas dificultades para realizar la inversión en infraestructura que esta globalización requiere para mantener el nivel de demanda. Por ello, el censo de animales ha experimentado un descenso y una tendencia a la baja desde hace unos años, siendo en enero de 2020 de unos 5.548.897 animales, lo que supone un 1,74% menos que en 2019 y un 6,3% menos que 10 años antes (Caracterización del Sector Cunícola, 2020, MAPA).

España es a día de hoy el mayor productor de carne de conejo a nivel de la Unión Europea, con Francia e Italia ocupando el segundo y tercer puesto, y concentrando entre los tres el 85% del total de la producción europea.

A pesar de ello, los cambios en las tendencias de consumo han conllevado un descenso de la producción en los últimos años, debido a que en la actualidad el consumo per cápita de carne de conejo ronda los 0,75kg por habitante y año.

De forma general, el mayor coste de producción al que se enfrenta cualquier sector dentro de la ganadería es el de la alimentación de los animales. Este coste se ve directamente afectado por el origen de las materias primas (con sus tasas de importación, costes de transporte, etc.) y por los rendimientos de las cosechas a nivel agrario. Los datos más recientes de los costes de esas materias primas se pueden observar en el gráfico 1 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España. 2020).

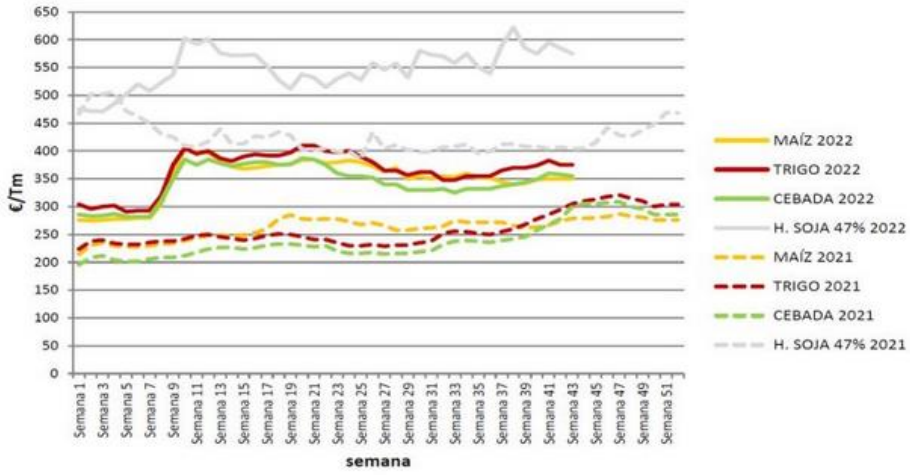


Gráfico 1. Evolución del precio de las materias primas empleadas en alimentación animal – Mercolleida, 2022.

Si a esto se suma que, en 2022, la guerra en Ucrania ha supuesto una subida sin precedentes de los precios de las materias primas dentro de la Unión Europea, que ya de por sí se venían encareciendo en los últimos años (Revista Cunicultura, 2014), se podría decir que el sector cunícola se encuentra en un equilibrio precario en lo que a coste-beneficio se refiere.

Por todo ello, el principal eje sobre el que se sostiene el sector cunícola, es la implementación de técnicas de manejo reproductivo eficientes y que garanticen los mejores resultados, así como la introducción de estrategias alimentarias que permitan alcanzar los objetivos productivos sin suponer un sobrecoste que desequilibre y perjudique la actividad económica del ganadero.

En contraposición a la alimentación *ad libitum*, que ha demostrado tener más efectos perjudiciales que positivos en varios momentos del ciclo reproductivo, sobre todo en hembras nulíparas y primíparas (Arias-

Álvarez *et al.*,2009), desde hace años se ha optado por la introducción de piensos suplementados con componentes que mejoran la calidad nutritiva del alimento (Rodríguez *et al.,* 2018), o que incrementan la digestibilidad de otros compuestos para mejorar su aprovechamiento, o bien se ha aumentado el porcentaje de fibras generadoras de saciedad pero degradables en nutrientes aprovechables para reducir los costes de alimentación. Igualmente, el control de la ración, apoyado por una vigilancia de los parámetros bioquímicos (Fernández-Pacheco *et al.*,2019) en determinados momentos concretos del ciclo ha reportado un ahorro en costes de materia prima que postula estas estrategias como buenas prácticas alternativas para mantener el rendimiento a niveles rentables sin que esto suponga un aumento de la inversión.

Por último, en lo que a consumo de productos de origen animal se refiere, es un hecho que la creciente preocupación y conciencia social por el Bienestar Animal dentro de las explotaciones productivas es un tema de actualidad y gran importancia para el público medio y que por lo tanto repercute en la economía de un sector ganadero como es la cunicultura. Aunque España continúa siendo uno de los países con mayor consumo de carne per cápita, el interés por opciones de alimentación basadas en productos de origen no animal sigue creciendo. Según datos aportados por la Unión Vegetariana Española, un estudio de la consultora Lantern, en 2019, arrojaba datos que indicaban un incremento del 27% en dos años en el número de personas que optaban por una opción libre de productos animales en su dieta. Según esta misma consultora, en 2021, el número de personas vegetarianas o veganas ha aumentado en otro 34%.

Esto tiene el potencial de continuar repercutiendo negativamente en las tendencias de consumo que se mencionaban previamente, por lo que la innovación, investigación y la transparencia en este ámbito son esenciales para poder mostrar que el sector ganadero, a pesar de tener como uno de sus principales objetivos la rentabilidad del sistema, también considera el Bienestar Animal una máxima y lo tiene como una de sus prioridades dentro de la investigación actual.

1.2 IMPORTANCIA DE LA NUTRICIÓN MATERNA EN PRODUCCIÓN Y BIENESTAR

Una vez establecido el peso de la alimentación como factor determinante en la continuidad y el margen de beneficio de la industria ganadera, se debe resaltar la importancia fisiológica del aporte de energía que obtienen los animales directamente de la dieta, y de todos los procesos involucrados con la homeostasis energética durante la gestación. Estos, influyen no sólo en los resultados productivos, sino también en el bienestar de los animales, ya que la disponibilidad e ingesta de alimento suponen un factor de estrés difícil de mitigar en los animales de producción (Gouvêa *et al.,* 2022).

En términos generales, una nutrición adecuada es imprescindible para el desarrollo normal de cualquier proceso biológico, pero en particular durante la gestación, la ingesta de alimento juega un papel clave. El aporte de energía y nutrientes durante la gestación puede tener consecuencias a largo plazo en la salud de la descendencia, debido a que una alimentación inadecuada puede inducir alteraciones no solo en la viabilidad del nuevo individuo a nivel orgánico, sino a nivel epigenético (Vickers *et al.*, 2015). La nutrición materna tiene efecto directo sobre el desarrollo y eficiencia de la placenta y, por lo tanto, sobre la disponibilidad de nutrientes para los fetos (López Tello *et al.*, 2017). Además de cubrir las necesidades metabólicas basales de la hembra, la nutrición durante el periodo de gravidez tiene que cumplir con las necesidades energéticas que implica el desarrollo fetal en todas sus fases, así como preparar ciertas reservas para afrontar el periodo de lactación y futuras gestaciones (Williamson, 2006; Herrera, 2000). El requerimiento adicional de energía durante la gestación deriva de la acumulación de grasa por parte de la hembra para afrontar procesos futuros, el aumento del consumo de oxígeno, la organogénesis y crecimiento fetal, y el desarrollo de la placenta (Richter *et al.*, 2009).

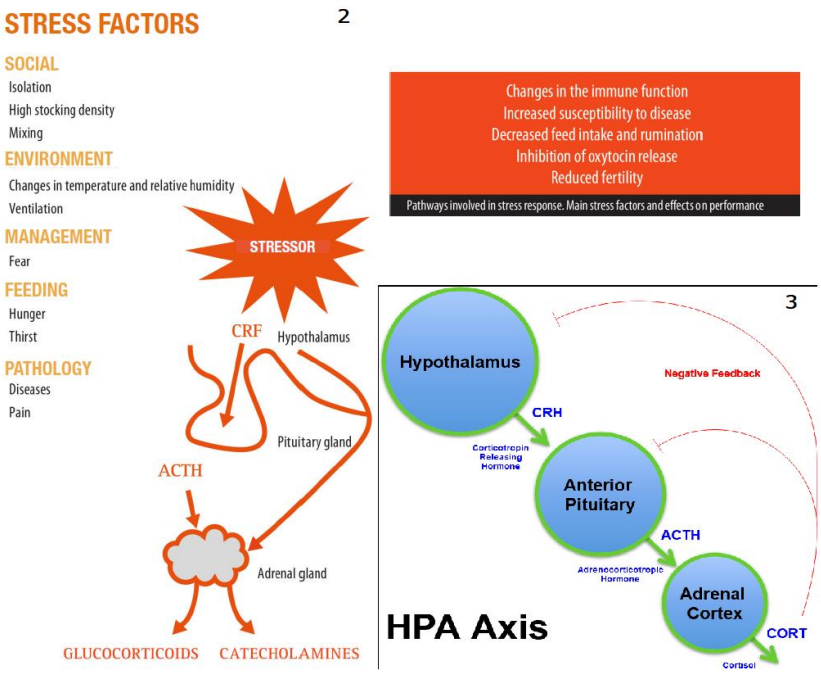
Como se ha expuesto anteriormente, en cunicultura una de las prioridades es la eficiencia en la producción, ya que ésta se relaciona directamente con los potenciales ingresos económicos derivados de la actividad. Los sistemas de cría son mayoritariamente de tipo intensivo, lo que suele implicar la concurrencia de procesos reproductivos, es decir: gestación y lactación se dan de forma simultánea (Castellini *et al.*, 2010). Los desequilibrios nutricionales y energéticos de las conejas pueden producir graves consecuencias a nivel metabólico y energético, pudiendo aparecer situaciones indeseables como hipoglucemias y aumento de niveles circulantes de metabolitos nocivos en sangre, como por ejemplo el β-hidroxibutirato o exceso de ácidos grasos no esterificados libres (NEFA; Martínez-Paredes *et al.*, 2012). Además, si las hembras gestantes carecen de una fuente de energía adecuada en la dieta, el balance energético negativo se ha asociado con problemas inmunológicos y mayor tendencia a reacciones inflamatorias (Al-Khalaifah *et al.*, 2020).

En este sentido, una consideración importante a la hora de aplicar diferentes regímenes de alimentación en cunicultura es el factor del estrés y sus consecuencias. En biología, el estrés se define como el estado fisiológico y comportamental provocado por estímulos adversos o negativos. Generalmente, el término más comúnmente utilizado para referirse al conjunto de procesos biológicos que se engloban en este fenómeno, y también para diferenciarlo de la situación psicológica que se suele asociar con esta palabra, es *distress* (en inglés), por lo que en adelante será el término empleado.

El distrés en los animales de producción tiene diversos componentes: social (aislamiento, sobrepoblación, reagrupaciones), ambiental (cambios de temperatura y humedad, ventilación), por manejo (miedo), por

patología (enfermedades, dolor) y en concreto el que nos interesa, el relacionado con la alimentación (hambre y sed).

A nivel fisiológico, Cannon (1915), describió el distrés como la reacción simpático-adreno-medular (SAM) del organismo para regular la homeostasis general ante la exposición a un estímulo o factor estresante. Posteriormente Selye (1936), llevó a cabo ensayos sobre la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (EHHA) frente a estímulos considerados nocivos que sugerían una reacción inespecífica del organismo y que implicaban un aumento de actividad del mencionado eje. El EHHA se activa mediante un estímulo externo denominado "de estrés", que produce liberación del factor liberador de corticotropina (CRF de sus siglas en inglés) a nivel hipotalámico, el cual hace su efecto en la hipófisis y produce la secreción de corticotropina u hormona adrenocorticotrópica (ACTH). La ACTH llega a las glándulas adrenales a través del torrente sanguíneo e induce la síntesis y secreción de glucocorticoides y catecolaminas, cuyos efectos son muy diversos a nivel sistémico. Algunos de ellos son: cambios en la función inmunológica, aumento de la susceptibilidad a enfermedades, descenso del consumo de comida, inhibición de la liberación de oxitocina y reducción de la fertilidad (Koolhaas *et al.*, 2011). Tanto SAM como EHHA se consideran los principales elementos mediadores del distrés y de la liberación de glucocorticoides y catecolaminas al plasma sanguíneo. (Gráfico 2). Cuando éstos compuestos se liberan, se reduce la respuesta inmune celular y aumenta la predisposición a padecer patologías, cuya consecuencia en el bienestar general de los animales es más que evidente. Como ejemplo, el estrés provocado por el destete repentino y/o precoz de las camadas, aumenta el riesgo de enfermedad digestiva en muchas especies de producción (Wei *et al.*, 2021).



Gráficos 2 y 3: (2) Ruta metabólica de la respuesta fisiológica al estrés. The Farm Animal Welfare Fact Sheet, abril 2013. Farm Animal Welfare Education Centre, Barcelona, España. (3) Diagrama de regulación del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal. (CRF, factor liberador de corticotropina; ACTH, hormona adrenocorticotrópica). The Weston A. Price Foundation, 2018

El distrés relacionado con la ingesta de comida es objeto de estudio desde hace tiempo, pero sus mecanismos siguen sin ser del todo conocidos. Sin embargo, algunos autores (Manteca *et al.*, 2013) indican que el efecto inhibitorio del distrés sobre el apetito está relacionado con la interacción entre los glucocorticoides, la leptina y la respuesta inmune celular.
Por otro lado, a día de hoy se ha comprobado que el distrés inducido por un estímulo nocivo puede regularse y mitigarse si el organismo es capaz de predecir y controlar la aparición del mismo, permitiendo una regulación más paulatina del EHHA (Colditz y Hine.,2016).

Una nutrición materna adecuada es esencial durante la gestación, pero se debe prestar atención adicional al segundo y al último tercio de la gestación para garantizar un peso óptimo al nacimiento (Rainforth, 2019). Estudios previos han demostrado que la alimentación materna restringida durante la gestación reduce el crecimiento de la descendencia y al desarrollo muscular (Govoni, 2022; Liefeld et al., 2019) y que la dieta materna puede programar el metabolismo de la descendencia en tejidos altamente metabólicos (Govoni, 2022). Por ello, en general, puede decirse que la nutrición materna juega un papel crucial en el desarrollo fetal y puede tener efectos duraderos en la salud y la eficiencia del crecimiento de las crías.

Por tanto, el estado metabólico y nutricional de las madres durante el ciclo reproductivo es esencial para poder alcanzar con éxito los objetivos de las granjas, y para ello la alimentación y el ritmo reproductivo deben correlacionarse y coordinarse muy estrechamente, cubriendo tanto las necesidades metabólicas basales de las conejas, como todas aquellas derivadas de la gestación y la lactación.

Por un lado, las hormonas tiroideas son cruciales en el desarrollo fetal, particularmente en cuanto al desarrollo del sistema nervioso (Patel et al., 2011; Pemberton et al., 2005). La función tiroidea fetal depende de la embriogénesis, diferenciación y maduración de la glándula tiroides, así como del desarrollo del eje hipotálamo-hipofisario-tiroideo y del metabolismo tiroideo hormonal (Patel et al., 2011). Durante la gestación, hay un aporte constante de tiroxina (T_4) materna, esencial para la neurogénesis temprana del feto. Por otra parte, las concentraciones de triyodotironina (T_3) se mantienen bajas en el feto durante la gestación debido al metabolismo de la placenta y la desyodasa fetal tipo 3 (Patel et al., 2011). Además, cada vez más estudios sugieren que incluso un hipotiroidismo materno leve puede conducir a anomalías en el desarrollo neurológico fetal (Patel et al., 2011).

Siendo la glucosa la principal molécula energética del organismo, su papel durante la gestación para contribuir al desarrollo fetal resulta indispensable. En ovejas (Zeitoun, 2017), ya se ha demostrado que el estado nutricional materno puede afectar al crecimiento fetal y el desarrollo y función de diversos órganos y sistemas, teniendo en cuenta que el 70-80% del desarrollo fetal ocurre en el último tercio de la gestación, y que cada día se profundiza más en el conocimiento del metabolismo de la glucosa durante la gestación gracias a la aparición de nuevas metodologías (Angueira et al., 2015).

En relación a la regulación de la glucosa, se conoce que la hiperglucemia e hiperinsulinemia fetales pueden causar múltiples complicaciones en el desarrollo fetal, como trayectorias de crecimiento alteradas, deterioro del desarrollo neuronal y cardíaco y agotamiento temprano del páncreas (Hufnagel et al., 2022). La expresión génica mediada por el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-2) también se altera en la restricción del crecimiento fetal, que se relaciona con un desarrollo y una función placentarios deficientes al principio de la gestación (Harris et al., 2019). Por lo tanto, se puede decir que la insulina juega un papel crucial en el desarrollo fetal, y la nutrición y la salud maternas durante la gestación pueden tener un impacto significativo en la regulación de la insulina fetal y los resultados de salud a largo plazo.

El colesterol (CHO) también cumple un papel notable en el desarrollo fetal, dado que sirve como precursor de los andrógenos y en las vías de señalización necesarias para la diferenciación sexual de los machos (Kothandapani et al., 2021). También es clave en la producción de esteroides neuroactivos, el desarrollo de las membranas de mielina y en general en el desarrollo fetal y embrionario, habiéndose asociado su déficit durante la gestación a algunos casos de autismo en humanos (Aneja y Tierney, 2008). Además, los principales ácidos grasos poliinsaturados del cerebro se componen parcialmente por colesterol: el ácido araquidónico ω-6 y el docosahexaenoico ω-3, formando parte de la membrana celular neuronal, y guardan una relación directa con el desarrollo normal del sistema nervioso central (Tajonar et al., 2023), por lo que una insuficiencia de estos compuestos en el suministro al feto podría acarrear consecuencias en la función cerebral.

Por otro lado, Swanson y Reiners (2020), sugieren que los aminoácidos juegan un importante papel en el desarrollo fetal y neonatal, por lo que deficiencias en este componente de la dieta durante estos periodos pueden provocar reducción del tamaño respecto al apropiado para la edad gestacional o retrasos en el crecimiento.

Asimismo, los ácidos grasos no esterificados (NEFA) se transfieren de la madre al feto a través de la placenta y son esenciales para el desarrollo normal y la maduración funcional del cerebro y el sistema nervioso central (Roque-Jiménez et al., 2021). Existen estudios (Elshani et al., 2021) que han demostrado que los NEFA son

beneficiosos en la regulación de la función metabólica materna y fetal, la inflamación, la inmunidad, el estrés oxidativo y el neurodesarrollo. Desequilibrios en la ingesta de ácidos grasos durante la gestación pueden afectar el crecimiento de la placenta, lo que a largo plazo puede afectar a la función neuroendocrina y al metabolismo energético del feto (Roque-Jiménez et al., 2021; Elshani et al., 2021).

Por ello, es primordial considerar que las estrategias alimentarias implementadas en producción deben tener en cuenta todos estos factores para cumplir unos requisitos básicos que garanticen su éxito: cubrir las necesidades de mantenimiento de las madres, permitir el adecuado desarrollo de la función reproductiva y de los fetos, y no ser un factor de estrés para los animales.

1.3 DESARROLLO FETOPLACENTARIO DEL CONEJO

La gestación es el proceso mediante el cual una hembra vivípara mantiene y desarrolla un feto o embrión en su matriz o aparato reproductor hasta el momento del parto. En los mamíferos, la duración de la gestación es variable según la especie, y se debe al grado de desarrollo que alcanza el feto en el periodo de gravidez, a la morfología del útero y a las características reproductivas de la especie concreta (duración del ciclo estral, ovulación espontánea o inducida, si la ovulación es simple o múltiple, etc.), así como a las interacciones endocrinas y moleculares que se producen entre el tejido uterino y los tejidos fetales (Chavatte y Guillomot, 2007). El periodo de gestación es, por tanto, el comprendido entre la fecundación y la implantación del zigoto y la expulsión del feto del útero en el momento del parto.

A su vez, la gestación se divide en varias fases, en cada una de las cuales se producen diferentes grados de diferenciación celular, y por lo tanto de desarrollo fetal.

Periodo preimplantacional:

El desarrollo preimplantacional del embrión comprende, de forma genérica, el periodo entre la fecundación del óvulo y la implantación en el endometrio uterino. En esta ventana de tiempo, el zigoto sufre una multiplicación de células por mitosis concatenadas que conforman los estadios iniciales del desarrollo. Como resultado de estas divisiones mitóticas, el número de células embrionarias, llamadas blastómeros, aumenta y pasa de 2, a 8 y 16 células progresivamente hasta alcanzar la fase de mórula. Posteriormente, los blastómeros migran para formar una cavidad central o blastocele, momento en el que embrión entra en fase de blastocisto. En las diferentes especies, estos procesos ocurren de manera distinta, distinguiéndose unas de otras desde el momento en el que el blastocele se convierte en el saco

amniótico y se pierde la zona pelúcida en el zigoto en cuanto al desarrollo del feto, la forma final del mismo y de la placenta, el tiempo de gestación, etc. (Stérba, 1995). En el conejo, esta fase tiene una duración aproximada de 3 días.

Implantación:

La fase de implantación ocurre cuando el blastocisto llega al útero y se adhiere a la pared uterina, y es el éxito de este proceso el que determina la viabilidad del feto (McGowen *et al.*, 2018). Esta fase se regula mediante las células del trofoblasto, las cuales coordinan el proceso de implantación, la remodelación de las arterias espirales uterinas, que proporcionan nutrientes y vascularización a la placenta y al futuro feto, y los primeros estadios de desarrollo de la placenta (Mossman, 1987).

En el momento de la implantación, el blastocisto presenta dos tipos de población celular: células ubicadas en la agrupación más interna, llamada embrioblasto, y células diferenciadas en la agrupación más exterior, llamadas trofoblasto. Es este último el encargado de originar la placenta, mientras que el embrioblasto se convierte en el embrión (Sadler, 2012). Según el tipo de interacción del trofoblasto con la pared uterina, se distinguen dos tipos de implantación: superficial o intersticial. En la primera, el trofoblasto se adhiere al epitelio luminal, mientras que, en la segunda, el blastocisto se une a pliegues de la mucosa e invade el endometrio. La implantación superficial es típica de especies como el conejo, el perro y el cerdo, mientras que los roedores y el ser humano presentan una implantación de tipo intersticial (Spencer *et al.*, 2007).

La proliferación de células del trofoblasto genera el corion, estructura vascular que conecta la circulación sanguínea de la hembra y del feto (Enders *et al.*, 1991). En este proceso, las células trofoblásticas se diferencian en otros subtipos que forman diferentes capas: una interna que no entra en contacto con los tejidos maternos, y una más externa que se diferencia en células epiteliales especializadas que sintetizan citoquinas antiinflamatorias y factores embrionarios para prevenir un rechazo por parte del tejido endometrial (Cha *et al.*, 2012).

Después, acontece la gastrulación, proceso en el que el embrioblasto se divide en dos capas: la más próxima al trofoblasto se denomina epiblasto, que a su vez da lugar a las tres líneas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) que forman el embrión y sus diferentes tejidos, así como a los tejidos que lo rodean (amnios y cordón umbilical); la capa más exterior que rodea el blastocele desarrolla el mesodermo extraembrionario y el saco vitelino, siendo determinante en la formación del eje axial y el

tejido nervioso. La gastrulación finaliza con la aparición de los somitos, bloques celulares precursores de diversos órganos y estructuras fetales, como vértebras, costillas o discos intervertebrales (Masamizu *et al.*, 2006).

ESPECIE	Llegada al útero (día)	Implantación (día)	Duración de la gestación (días)
Ratona	3	4,5	20
Coneja	3	6,5	31
Mujer	3-4	5-7	280
Cerda	2	14	115
Oveja	4	15	145
Vaca	4	19-20	280
Yegua	5-6	30	330

Gráfico 4: Tabla ilustrativa de los tiempos de implantación en diversas especies. Fuente: López Tello, UPM, 2016

Aunque en la coneja la implantación se produce entre los días 6 y 7 de gestación, existe un periodo crítico en el que puede producirse una interrupción de la misma que se prolonga hasta el día 18 de gestación (García *et al.*, 2021), donde factores como la condición corporal y el perfil hormonal de la hembra juegan un importante papel, ya que determinan fenómenos como la tasa de ovulación y la calidad de los óvulos (Arias-Álvarez *et al.*, 2009). De hecho, entre un 20% y un 40% de los óvulos producidos por el ovario no llegan a producir implantación (Blasco *et al.*, 1993), y varios autores (Argente *et al.*, 2003; Akkuş y Erdoğan, 2019) relacionan la supervivencia fetal temprana con el desarrollo de la placenta, el espacio disponible para el desarrollo fetal y el aporte vascular recibido.

Imagen 2: Implantación embrionaria del conejo. Enders y Schafle, 1971.

Placentación:

Se conoce como placentación a la formación de las membranas extraembrionarias que protegen y albergan al embrión durante la gestación. La placenta es un órgano transitorio que resulta clave para que la gestación llegue a término, aportando protección inmunológica al feto frente al sistema inmune de la madre y frente a posibles agentes patógenos. Se trata además de un órgano endocrino capaz de producir

y secretar varias hormonas como estrógenos, progesterona, leptina y lactógeno placentario, y también factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico o los factores de crecimiento similares a la insulina I y II. Estos productos pueden ejercer su acción de forma autocrina, paracrina y endocrina, siendo además la placenta un órgano altamente especializado en el intercambio de gases y moléculas como carbohidratos, aminoácidos, lípidos, vitaminas y minerales (Carter, 2012).

Estructuralmente, la placenta se divide en tres partes: placenta fetal, placenta decidua y la zona de unión entre ambas. La placenta fetal es aquella que sirve de origen para las membranas fetales (vellosidades coriónicas, alantoides y saco vitelino vestigial) y que está en contacto solamente con el feto. La placenta decidua es la que está en contacto con los tejidos maternos, con una región que conecta directamente con las células del trofoblasto y otra que crea una cubierta entre el endometrio y estas células y que crece alrededor del embrión (Adamson, 2002). El punto donde se unen las vellosidades coriónicas de la placenta fetal y la placenta decidua se conoce como nexo, y es el lugar de secreción de los factores de crecimiento y las hormonas relacionadas con la gestación que se mencionaban previamente (Hayashi *et al.*, 2014).
Las estructuras vasculares que se crean en la decidua son imprescindibles para el suministro de sangre al feto, a través del cual se regulan los intercambios de nutrientes y gases (Carter, 2007; Adamson, 2002). Para ello, la decidua debe permitir cierta infiltración de algunas células trofoblásticas para crear el complejo sistema vascular que permite este intercambio. Una vez desarrollada la placenta, ésta recibe vascularización tanto por parte de la hembra como por parte del feto.

El feto en desarrollo se encuentra unido a la placenta mediante el cordón umbilical. La vascularización feto-placenta se subdivide en dos sistemas, donde las arterias umbilicales transportan sangre desoxigenada y sin nutrientes desde el feto a la hembra, y la vena umbilical aporta sangre oxigenada y llena de nutrientes al feto (Wang, 2010).

Según el grado de unión entre las membranas fetales coriónicas y la pared uterina, las placentas de los mamíferos se clasifican en:

- Epiteliocoriales: la unión es superficial y poco invasiva, por lo que no hay destrucción de tejidos maternos ni daño en el endometrio. Típica de la yegua, suidos, y rumiantes.
- Endoteliocorial: el epitelio uterino y el tejido conectivo se pierden y las células trofoblásticas están en contacto directo con el tejido endometrial. Típica de carnívoros marinos y terrestres y de la elefanta.

- Hemocorial: considerado el tipo de placentación más invasivo, dado que todas las capas de tejido materno se pierden debido a la erosión y la sangre materna está en contacto directo con el corion. Se clasifica a su vez en hemomonocorial (típica de primates), hemodicorial (conejos), hemotricorial (roedores).

Desarrollo fetal:

En los primeros momentos de la gestación, el embrión es de tamaño microscópico y su demanda de energía es muy baja (Butte *et al.*, 2005). Su crecimiento se modula mediante diferentes factores metabólicos y endocrinos que requieren la interacción entre la hembra, la placenta y el feto, lo cual requiere una correcta homeostasis energética de la hembra y una respuesta metabólica coordinada para mantener la gestación (Bauman y Currie, 1980).

Durante los primeros días desde la implantación, comienza el proceso de embriogénesis, donde se desarrolla la masa celular que dará lugar al nuevo individuo, así como el desarrollo de la placenta y las membranas fetales. Hacia la mitad de la gestación, tiene lugar la organogénesis fetal y un crecimiento fetal considerable (Cappon *et al.*, 2005); este crecimiento se puede considerar por un lado cualitativo en relación al desarrollo y maduración de los órganos internos del feto, y cuantitativo en términos del tamaño y peso totales del feto. El crecimiento cuantitativo se observa principalmente en el último tercio de la gestación, momento en el que mayor demanda energética tiene (Fortun-Lamothe, 2006), por lo que la ingesta de la madre es clave en este punto.

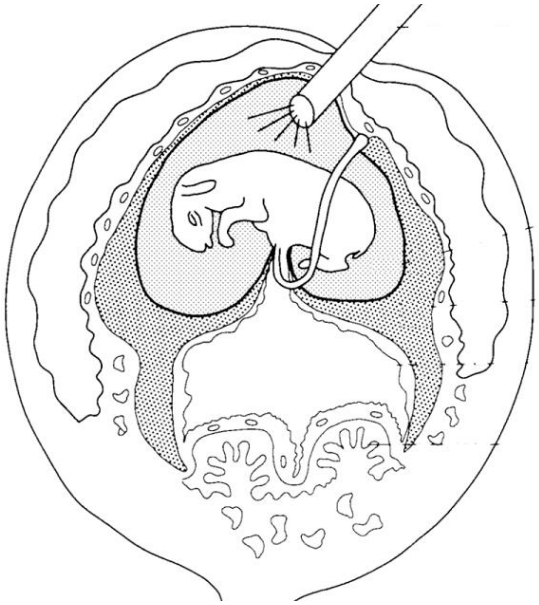


Imagen 2: Placentación del conejo. Ramsey, 1982.

En las primeras etapas de la gestación, una buena alimentación es imprescindible para cubrir las demandas de la actividad metabólica embrionaria y los cambios que se producen en el feto durante su crecimiento, y así evitar que el desarrollo fetal se vea comprometido (Redmer *et al*., 2004). La placenta responde activamente a las señales nutricionales y metabólicas de la madre y el feto, integrando señales nutricionales de ambos con información de las vías de señalización de detección de nutrientes y con el objetivo de regular el suministro materno de nutrientes para adecuarlo a la demanda fetal mediante la regulación de la fisiología materna, el crecimiento placentario y transporte de nutrientes (Díaz *et al.*, 2014). De esto se deduce que una nutrición materna deficiente tiene un impacto negativo en el crecimiento de la placenta y una regulación a la baja de los transportadores de nutrientes, lo que limita el crecimiento fetal para garantizar la supervivencia materna (Gaccioli *et al*., 2013).

1.4 METABOLISMO ENERGÉTICO

1.4.1 Hormonas tiroideas: tiroxina y triyodotironina.

TIROXINA

Estructura química:

La tiroxina (T_4) es una hormona tiroidea cuya estructura química se compone de dos anillos aromáticos unidos por un puente de cuatro átomos de carbono con dos átomos de yodo en cada anillo. Es sintetizada a partir de la combinación de la molécula de aminoácido tirosina y tres átomos de yodo, y se libera a la circulación sanguínea, donde es transportada por proteínas transportadoras específicas.

Metabolismo:

La tiroxina es sintetizada en la glándula tiroides a partir de la tirosina, un aminoácido esencial, y el yodo, que se obtiene de la dieta. La tirosina es iodada y se acopla con otra tirosina iodada en la tiroglobulina, una proteína almacenada en la glándula tiroides, para formar la tiroxina. La T_4 es secretada por la glándula tiroides en la circulación sanguínea y se une a proteínas transportadoras en la sangre, principalmente la globulina fijadora de tiroxina (TBG).

La mayoría de la tiroxina que circula en la sangre es convertida a triyodotironina (T_3) en los tejidos periféricos por la enzima 5'-deyodinasa tipo 2 (Bianco y Silva, 1987). La T_3 es la forma biológicamente activa de las hormonas tiroideas y se une a receptores específicos en las células para regular la expresión de genes involucrados en el metabolismo celular (Stagnaro-Green y Abuhamad, 2016).

La tiroxina y la triyodotironina son degradadas y eliminadas principalmente por el hígado y los riñones. La enzima 5'-deyodinasa tipo 1 elimina un átomo de yodo de la posición 5 del anillo externo de la molécula de T_4 para formar triyodotironina inversa (rT_3), una forma inactiva de la hormona. El rT_3 puede ser degradado aún más a diiodotirosina y monoiodotirosina, que pueden ser recicladas para formar nuevas moléculas de tirosina (Braverman y Cooper, 2013).

Funciones biológicas:

La tiroxina es la forma principal en que se almacena y se secreta la hormona tiroidea en la glándula tiroides. La tiroxina (junto con la triyodotironina) regula el metabolismo en el organismo al afectar la síntesis de proteínas, el consumo de oxígeno y la producción de calor. También regula el desarrollo y la maduración del cerebro, el sistema nervioso y los huesos. Asimismo, juega un papel importante en la regulación de la temperatura y peso corporales (Gardner y Shoback, 2011).

TRIYODOTIRONINA

Estructura química:

La triyodotironina (T_3) es una hormona tiroidea producida por la glándula tiroides con una estructura química similar a la de la tiroxina (T_4). La T_3 es sintetizada a partir de la tiroxina por la enzima 5'-deyodinasa, que elimina un átomo de yodo de la posición 5 del anillo externo de la molécula, lo que le confiere una mayor actividad biológica (Bianco y Kim, 2006; Silva *et al.*, 2016).

Metabolismo:

La T_3 producida se une a proteínas transportadoras en la sangre y se distribuye a través del organismo hasta que llega a las células. Allí, se une a receptores específicos y activa la expresión de genes involucrados en el metabolismo celular. La T_3 también puede ser convertida en una forma inactiva llamada reverse T_3 (rT_3) por la enzima 5'-deyodinasa tipo 3 (Brent, 2012; Cioffi *et al.*, 2013). La T_3 y el rT_3 son eliminadas del organismo principalmente por los riñones. La T_3 es degradada a diiodotirosina y monoiodotirosina, que son recicladas para formar nuevas moléculas de tirosina. La rT_3 también es eliminada por los riñones o puede ser convertido de nuevo a T_3 por la enzima 5'-deyodinasa tipo 1 (Kampe *et al.*, 2015).

Funciones biológicas:

La triyodotironina es la forma activa de la hormona tiroidea T_4, y es responsable de la mayoría de los efectos biológicos de ésta. Regula el metabolismo de síntesis de proteica, el consumo de oxígeno

y la producción de calor. Además, la T_3 regula el crecimiento y la maduración de los tejidos, incluyendo el cerebro y el sistema nervioso (Chopra y Huang, 2012).

La T_3 también juega un papel importante en el mantenimiento de la temperatura y la regulación del peso corporal. Regula la expresión de genes involucrados en la termogénesis (producción de calor), lo que contribuye a mantener una temperatura corporal constante. Además, la T_3 aumenta la tasa metabólica basal del organismo, lo que ayuda la movilización de las reservas corporales (Blanco y Silva, 1987).

1.4.2 Glúcidos: glucosa, insulina e índice HOMA-IR.

GLUCOSA

Estructura química:

La glucosa es un monosacárido, principal fuente de energía para la mayoría de las células del organismo. Es una molécula hidrosoluble que se encuentra en la sangre y otros fluidos corporales, y sirve como precursor para la síntesis del tejido adiposo que conforma las reservas corporales.

La glucosa es una hexosa, contiene seis átomos de carbono, doce átomos de hidrógeno y seis átomos de oxígeno ($C_6H_{12}O_6$). Es una molécula con una estructura cíclica, donde uno de los átomos de oxígeno se une a uno de los carbonos de la molécula para formar un anillo.

Metabolismo:

La glucosa es la principal molécula energética a nivel sistémico. Se metaboliza en las células a través de la glucólisis, en la que se descompone en dos moléculas de piruvato. A continuación, el piruvato entra en el ciclo de Krebs, donde se oxidan los grupos funcionales y se produce una gran cantidad de NADH y $FADH_2$ (Berg *et al.*, 2002). Estas moléculas son transportadas a través de una cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna, lo que conduce a la producción de una gran cantidad de ATP. La glucosa también puede ser almacenada en el hígado y los músculos en forma de glucógeno para su uso posterior.

La principal fuente de glucosa son los carbohidratos. Éstos se descomponen en moléculas más simples durante la digestión del alimento, y la glucosa es absorbida en el intestino para pasar al torrente sanguíneo. No obstante, los lípidos y proteínas también pueden ser convertidos en glucosa mediante la gluconeogénesis (Cahill, 2006). En este proceso, que ocurre principalmente en el hígado, los lípidos se descomponen en ácidos grasos y glicerol, que a su vez se convierte en glucosa y se libera a sangre circulante. En condiciones de elevada demanda energética o déficit nutricional, los

aminoácidos de las proteínas también pueden emplearse como fuente de glucosa (Adeva-Andany *et al.*, 2016).

El uso de glucosa a nivel metabólico se regula mediante la insulina, sintetizada en las células β de los islotes de Langerhans del páncreas.

Funciones biológicas:

La glucosa es esencial para el metabolismo celular y la producción de energía. Interviene en la organogénesis fetal y en la síntesis celular, y es empleada como precursor de los ácidos nucleicos y los aminoácidos, que son esenciales para la formación de proteínas y otros componentes celulares.

El hígado es el principal órgano encargado mantener los niveles de glucosa en sangre circulante, y los hepatocitos suponen, junto con el músculo esquelético, los principales reservorios de moléculas de glucosa en forma del polisacárido llamado glucógeno. La homeostasis de la glucosa en sangre se lleva a cabo por acción del páncreas mediante la liberación tanto de insulina como de glucagón en función de si es necesario aumentar o disminuir los niveles plasmáticos de glucosa, respectivamente.

INSULINA

Estructura química:

La insulina es una hormona polipeptídica compuesta por dos cadenas de aminoácidos unidas por puentes disulfuro. La cadena A consta de 21 aminoácidos y la cadena B de 30 aminoácidos.

La conformación estructural de la insulina es esencial para su actividad como hormona. Es sintetizada y almacenada en el organismo en forma de un hexámero, mientras que su forma activa es la de una hormona monómero.

Metabolismo:

La insulina es sintetizada y almacenada en las células β del páncreas, presentes en los islotes de Langerhans. Cuando los niveles de glucosa en sangre aumentan, es liberada en el torrente sanguíneo, donde se une a receptores en la superficie de las células de diferentes tipos que permiten que la glucosa entre en las mismas para su aprovechamiento a nivel energético (Guyton y Hall, 2015).

La insulina se degrada enzimáticamente en el hígado y en otros tejidos, como los riñones y el músculo esquelético (Becker, 2019). La degradación se lleva a cabo por proteasas y peptidasas, que dividen la molécula de insulina en fragmentos más pequeños, que son excretados posteriormente. Otra parte se elimina a través de los riñones: la insulina intacta y sus metabolitos son filtrados por los riñones y eliminados en la orina.

En general, la insulina se metaboliza y elimina rápidamente del organismo después de cumplir su función, aunque su velocidad de eliminación puede variar según factores como la edad, la función renal y hepática y la presencia de ciertas enfermedades.

Funciones biológicas:

La función principal de la insulina es regular los niveles de glucosa en sangre. Cuando aumentan, la insulina es secretada por el páncreas y estimula la entrada de glucosa en las células, que es usada como fuente de energía. También regula la síntesis y el almacenamiento de glucógeno en el hígado y los músculos.

Además, interviene en la síntesis de proteínas en procesos de regeneración del daño tisular (Cardona *et al.*, 2009) y en cierta medida en la regulación de lípidos, estimulando la síntesis de ácidos grasos y la inhibición de la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo, lo que ayuda a mantener los niveles normales de lípidos en sangre, y también interviene en menor medida en la absorción de aminoácidos (Hosokawa *et al.*, 2016; Biolo y Wolfe 1993; Müller-Wieland y Diederich, 2019).

ÍNDICE HOMA-IR:

El índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment) es un parámetro clínico frecuentemente empleado en medicina para evaluar la resistencia a la insulina y la función de las células β del páncreas. La resistencia a la insulina es una respuesta biológica insuficiente por parte del organismo a la acción de esta hormona, que puede darse en estados patológicos y en ciertas situaciones fisiológicas como son la gestación, la pubertad y ciertos niveles de estrés. En estados de resistencia a la insulina, las células transformadoras de glucosa (miocitos, hepatocitos, adipocitos) no pueden absorber la insulina de manera adecuada, y por lo tanto la glucosa es incapaz de entrar en estas células. Mientras las células pancreáticas sean capaces de sintetizar suficiente insulina para compensar esta débil respuesta celular, la homeostasis se mantiene y los niveles de glucosa en sangre permanecen normales. Si la síntesis de insulina en el páncreas falla, tiene lugar la resistencia a la insulina.

Este parámetro se detecta mediante pruebas en sangre, y lo habitual para evaluar este parámetro es tomar las muestras en ayunas.

Su fórmula es:

$$HOMA - IR = Insulina\ x \frac{\left(\frac{Glucosa}{18}\right)}{22{,}5}$$

Y su interpretación es:

Puntuación	Interpretación
Valores inferiores a 1,96	Sin resistencia a la insulina.
Valores de 1,96 a 3	Sospecha de resistencia a la insulina, requiere pruebas adicionales.
Valores superiores a 3	Resistencia a la insulina

1.4.3 Lípidos: colesterol, triglicéridos y ácidos grasos no esterificados.

COLESTEROL

Estructura química:

El colesterol es un lípido esteroideo que se encuentra en las membranas celulares y en el plasma sanguíneo (Goldstein y Brown, 1990; Tudela, 2008). Su estructura química incluye un núcleo esteroidal compuesto por cuatro anillos fusionados y una cadena lateral hidrocarbonada. El colesterol también contiene un grupo hidroxilo (-OH) en posición 3 de su estructura. Es insoluble en agua, pero se puede transportar en el plasma sanguíneo unido a proteínas transportadoras o lipoproteínas.

Metabolismo:

El colesterol puede ser sintetizado en el organismo por vía endógena o incorporarse por vía exógena a partir de la dieta.

La biosíntesis del colesterol es un proceso complejo que se lleva a cabo principalmente en el hígado y en menor medida en otras células del organismo. Se sintetiza a partir de precursores como el acetil-CoA y la acetil-acetil-CoA. El proceso de síntesis implica una serie de pasos enzimáticos que se llevan a cabo en el retículo endoplásmico y en el citosol. Este proceso se inicia con la enzima acetil-CoA carboxilasa, que convierte el acetil-CoA en malonil-CoA. El malonil-CoA se utiliza en la síntesis de ácidos grasos, que son componentes importantes de las lipoproteínas. La síntesis de colesterol se produce a partir del acetil-CoA a través de una serie de reacciones enzimáticas catalizadas por la enzima HMG-CoA reductasa (López, 2007; Saavedra *et al.*, 2012).

La HMG-CoA reductasa cataliza la reducción del HMG-CoA a mevalonato. El mevalonato se convierte en isoprenoides como el escualeno, que se utiliza como precursor del núcleo esteroidal del colesterol. El escualeno se convierte en lanosterol, que es el precursor del colesterol. Tras otras 21

reacciones enzimáticas catalizadas, el lanosterol se convierte finalmente en colesterol. Su unión a complejos macromoleculares como son las lipoproteínas (LDL y HDL) hace posible su transporte hasta los tejidos, donde puede ser utilizado para la síntesis de hormonas y otras moléculas (Arnesto *et al.*, 2011; Molina *et al.*,2012).

En cuanto a su regulación, la producción de colesterol por vía endógena se correlaciona directamente con las concentraciones de colesterol presentes en el retículo endoplásmico que, a su vez, están relacionadas con las concentraciones plasmáticas de lipoproteínas de baja densidad (LDL). El principal mecanismo regulador es la proteína SREBP 1 y 2 (Sterol Regulatory Element Binding Protein), que detecta la concentración intracelular de colesterol y desencadena las reacciones de transcripción de, entre otros, los genes del receptor de LDLy la hidroxi-metil-glutaril CoA-reductasa (HMG-CoA-reductasa), la enzima limitante en la vía biosintética del colesterol.

Una ingesta elevada de colesterol disminuye la síntesis de colesterol en el hígado, mientras que las hormonas como la insulina y el glucagón pueden regular la actividad de la HMG-CoA reductasa y, por lo tanto, la síntesis de colesterol (Aitman *et al.*, 2000; León *et al.*, 2002).

Funciones biológicas:

1. Estructural: está presente en las membranas plasmáticas de las células animales. Se encuentra en una proporción molar 1:1 con relación a los fosfolípidos, regulando las propiedades físico-químicas de la membrana (Van Meer *et al.*, 2008).
2. Síntesis de Vitamina D, hormona fundamental para el metabolismo del calcio.
3. Precursor de las hormonas sexuales: progesterona, estrógenos y testosterona (Márquez-Velasco y Fernández, 2016).
4. Precursor de las hormonas corticoides: cortisol, corticosterona y aldosterona, entre otros (Nishimoto y Rainey, 2008).
5. Precursor de las sales biliares: las sales biliares son una de las vías de excreción del colesterol, además de favorecer la digestibilidad y absorción de los lípidos a nivel digestivo, ya que contribuyen a su solubilidad (Arenas *et al.*,2008).

TRIGLICÉRIDOS

Estructura química:

Los triglicéridos son un tipo de lípido que se encuentra en los alimentos y en el tejido adiposo del organismo. Su estructura química se compone de una molécula de glicerol y tres ácidos grasos unidos a ella mediante enlaces éster. Cada ácido graso está unido al glicerol por su grupo hidroxilo (-

OH), lo que forma un enlace éster (-COO-) entre el ácido graso y el glicerol. Los ácidos grasos unidos al glicerol varían según la molécula, ofreciendo diferentes combinaciones y, por lo tanto, diferentes tipos de triglicéridos (Mozaffarian, 2016).

Metabolismo:

La síntesis de triglicéridos se produce en el hígado y en el tejido adiposo. Los ácidos grasos se sintetizan en el citosol celular y se unen al glicerol-3-fosfato para formar diacilglicerol. El diacilglicerol se convierte en triglicéridos mediante la adición de otro ácido graso, que se produce en el retículo endoplásmico. Los triglicéridos se almacenan en los adipocitos, células especializadas del tejido adiposo, vía gluconeogénesis (Yen *et at.*, 2012).

En estados de demanda energética, las catecolaminas producidas a nivel adrenal estimulan la producción de glucagón y liberan los ácidos grasos de los triglicéridos almacenados en los adipocitos para ser empleados como fuente de energía. Estos ácidos grasos se transportan como complejos de albúmina o en forma esterificada unidos a lipoproteínas a través del torrente sanguíneo y se oxidan en el hígado, el músculo y otros tejidos para producir energía (Talayero y Sacks, 2011). El componente más energético de los triglicéridos a nivel metabólico es la molécula de glicerol, ya que puede ser convertida en glucosa más fácilmente. Para que los ácidos grasos supongan una fuente de energía, deben reconvertirse en grupos cetónicos mediante el proceso conocido como β-oxidación de ácidos grasos (Lodish *et al.*, 2000).

Los triglicéridos son eliminados del cuerpo a través de diferentes mecanismos, incluyendo la mencionada β-oxidación, la excreción biliar y la eliminación renal (Sánchez-Margalet y Vallejo-Vaz, 2018).

La excreción biliar implica la secreción de ácidos biliares y colesterol por el hígado en la bilis, que luego se almacena en la vesícula biliar antes de ser liberada en el intestino delgado para ayudar en la digestión y absorción de las grasas. Los triglicéridos también son excretados junto con la bilis y se eliminan del organismo a través de las heces. También pueden ser eliminados por los riñones a través de la orina, aunque este proceso de eliminación es menos común y ocurre en casos de niveles extremadamente altos de triglicéridos en la sangre.

Funciones biológicas:

Además de como fuente de energía en forma de calor metabólico durante su degradación, los triglicéridos que conforman el tejido adiposo actúan como aislante térmico, protegiendo al organismo de la pérdida de calor, y protegiendo los órganos vitales de los impactos (Bajerska *et al*,

2015). También sirven como precursores para la síntesis de otros lípidos importantes, como los fosfolípidos, que son componentes esenciales de las membranas celulares.

ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS (NEFA):

Estructura química:

Los ácidos grasos no esterificados (NEFA; Non Esterified Fatty Acid), también conocidos como ácidos grasos libres (AGL), son moléculas de ácidos grasos que se encuentran en la circulación sanguínea en forma libre y no unidos a una molécula de glicerol.

La estructura química de los NEFA es la misma que la de los ácidos grasos que se encuentran en los triglicéridos: una molécula formada por una cadena hidrocarbonada larga y un grupo carboxilo (-COOH) en un extremo. La longitud de la cadena hidrocarbonada puede variar de unos pocos a más de 20 átomos de carbono y puede ser saturada (todos los enlaces carbono-carbono son simples) o insaturada (al menos un enlace carbono-carbono es doble).

Metabolismo:

Los NEFA pueden ser producidos a partir de los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo o ser sintetizados en el hígado a partir de otros compuestos como la glucosa y los aminoácidos. Sin embargo, también pueden existir en la circulación sanguínea en forma libre y no unidos a una molécula de glicerol.

La oxidación de NEFA en los tejidos comienza con su activación, mediante la adición de una molécula de coenzima A (CoA), produciendo ácidos grasos activados (Acil-CoA). Los Acil-CoA se unen entonces a la carnitina (dando Acil-carnitina) para ser transportados a través de la membrana mitocondrial interna (Murray *et al.*, 2018).

Una vez que los Acil-CoA se encuentran en la matriz mitocondrial, la β oxidación comienza con la separación de dos carbonos del extremo del grupo carboxilo del ácido graso. Cuando se han separado todos los grupos de dos carbonos, el producto es Acetil-CoA. Éste ingresa posteriormente en el ciclo de Krebs, produciendo NADH y $FADH_2$, que se utilizan en la fosforilación oxidativa para producir ATP.

Funciones biológicas:

Los ácidos grasos no esterificados (NEFA) son una importante fuente de energía para tejidos como el músculo y el hígado. Cuando las reservas de glucógeno en el organismo se agotan, el organismo recurre a las reservas de grasa en el tejido adiposo. La cantidad de energía almacenada en las

reservas de grasa es mucho mayor que la almacenada en las reservas de glucógeno, lo que significa que los NEFA pueden proporcionar una fuente de energía sostenida durante períodos más largos de tiempo.

Además, los NEFA también son precursores en la síntesis de otros lípidos y moléculas importantes, por ejemplo, hormonas esteroides como cortisol y la testosterona (Curi *et al.*, 2005).

1.5 GLUCOCORTICOIDES: CORTISOL vs. CORTICOSTERONA

CORTISOL

Estructura química:

El cortisol es una hormona esteroidea producida por la glándula adrenal en respuesta al estrés. Su estructura química se basa en un núcleo esteroideo compuesto por tres anillos de seis carbonos y uno de cinco carbonos fusionados, con una cadena lateral de átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno.

Metabolismo:

La metabolización del cortisol ocurre en varios tejidos, incluyendo el hígado, los riñones y los tejidos musculares, y la velocidad del proceso varía según la edad, el sexo, la dieta y el estado de salud. El cortisol es metabolizado principalmente por dos enzimas: la 11-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11-beta-HSD1) y la 11-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11-beta-HSD2). La primera convierte la hormona inactiva cortisona en cortisol activo en los tejidos periféricos, mientras que la segunda hace lo contrario, convirtiendo el cortisol activo en cortisona inactiva en los riñones (Charmandari *et al.*, 2005).

El cortisol se metaboliza en el hígado mediante procesos de oxidación y conjugación con ácido glucurónico, que lo hacen más soluble en agua y más fácil de excretar por la orina. También puede metabolizarse por las enzimas citocromo P450 en el hígado y otros tejidos, lo que conduce a la formación de metabolitos de cortisol, algunos de los cuales tienen propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras (Bjorntorp, 1992).

La excreción del cortisol ocurre principalmente a través de los riñones, donde se excreta en forma de metabolitos conjugados con ácido glucurónico y sulfato. También se puede excretar por la saliva y las heces.

Funciones biológicas:

El cortisol tiene varias funciones en el organismo.

Por un lado, contribuye a la regulación de los niveles de glucosa en la sangre, estimulando la gluconeogénesis (producción de glucosa a partir de fuentes no carbohidratadas) y disminuyendo la captación de glucosa en los tejidos periféricos (Abercrombie y Kalin, 2018). Por otro, actúa como inmunomodulador, suprimiendo la respuesta inmune y reduciendo la inflamación en todo el organismo.

Además, el cortisol también tiene efectos sobre el metabolismo de proteínas y grasas, aumentando la degradación de proteínas y liberando ácidos grasos del tejido adiposo para ser utilizados como fuente de energía. También puede actuar como un vasoconstrictor, disminuyendo el flujo sanguíneo en algunos tejidos (Becket y Best, 1986).

Niveles plasmáticos elevados de cortisol mantenidos en el tiempo, se han correlacionado con aumento de la presión arterial, la disminución de la densidad ósea y la supresión del sistema inmunológico (Hua *et al.*, 2020; Rhen y Cidlowski, 2005).

CORTICOSTERONA

Estructura química:

La corticosterona es una hormona esteroidea cuya síntesis ocurre en las glándulas adrenales. Aunque su estructura es similar a la del cortisol, la corticosterona es un glucocorticoide, lo que significa que tiene un mayor efecto en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y grasas en el organismo. Su estructura química se caracteriza por la presencia un anillo ciclopentanoperhidrofenantreno, así como un grupo funcional cetona en la posición 3 y un grupo hidroxilo en la posición 11.

Metabolismo:

La corticosterona se produce a partir del colesterol. Su producción está regulada por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), producida por la hipófisis a nivel cerebral. La ACTH estimula la producción de corticosterona por las glándulas adrenales principalmente (Tortora y Derrickson, 2017).

Después de ser liberada en el torrente sanguíneo, la corticosterona se une a proteínas transportadoras y se distribuye por todo el organismo, para acabar siendo metabolizada en el hígado, donde se somete a una serie de reacciones químicas que la convierten en metabolitos inactivos que se excretan en la orina. La enzima responsable de la inactivación de la corticosterona

es la 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11β-HSD2), que convierte la corticosterona en 11-dehidrocorticosterona (un metabolito inactivo).

Funciones biológicas:

1. Regulación de la respuesta inflamatoria: la corticosterona es un inmunomodulador y ayuda a reducir la inflamación mediante la inhibición de la síntesis de citoquinas inflamatorias y liberación de enzimas lisosómicas (Elenkov y Chrousos, 2002).
2. Regulación del metabolismo de los carbohidratos, proteínas y grasas: la corticosterona ayuda a regular los niveles de glucosa en la sangre mediante precursores no glucídicos, y también interviene en el metabolismo proteico y movilización de reservas corporales (Watlington *et al*., 1992).
3. Regulación del equilibrio de agua y electrolitos.
4. Regulación de la presión arterial: La corticosterona puede actuar sobre los riñones para aumentar la reabsorción de sodio y agua en los túbulos renales, lo que lleva a un aumento en el volumen de sangre circulante y, por tanto, a un aumento en la presión arterial. También actúa aumentando la sensibilidad de los vasos sanguíneos a vasoconstrictores como la adrenalina y noradrenalina, que se liberan en respuesta al estrés. Además, la corticosterona puede interactuar con otras hormonas que regulan la presión arterial, como la angiotensina II y la aldosterona (Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014).
5. Regulación del sistema inmunológico: los glucocorticoides como la corticosterona actúan como agentes inmunosupresores y tienen efectos inhibitorios sobre la inmunidad de base celular y la respuesta mediada por anticuerpos a largo plazo (McEwen, 2007).

1.6 ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

En los últimos años, tanto el Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, como el Departamento de Producción la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y Biosistemas de la Universidad Politécnica de Madrid, han volcado sus esfuerzos y gran parte de su producción científica de manera conjunta en el estudio de la fisiología reproductiva del conejo como especie productora y abarcando temas como la mejora de la productividad, el perfeccionamiento de la nutrición de las madres en fase de cría, la suplementación de los piensos de animales en periodo de cebo, la calidad de la canal resultante y la profundización en el conocimiento de los procesos fisiológicos de la reproducción para poder implementar técnicas alternativas de manejo y estrategias alimentarias basadas en esta investigación.

Los primeros trabajos se enfocaron en la aplicación de diferentes técnicas de manejo reproductivo para promover la funcionalidad ovárica, optimizar la inducción de la ovulación comparando métodos no hormonales con administración exógena de inductores de la ovulación, y se ha trabajado en perfeccionar la técnica de la inseminación artificial (IA) (Rebollar *et al.,* 2006; 2011; 2012). Los resultados demostraron mejorar los índices productivos de las conejas en sus primeros ciclos, convirtiéndose la IA en una técnica habitual en los trabajos del grupo.

En el ámbito de la nutrición, y con el objetivo no sólo de mejorar características reproductivas de las madres, sino de aportar un valor añadido a la ya de por sí deseable composición de la carne de conejo (Rodríguez *et al.,* 2017ab;2018), se ha trabajo en el uso de dietas suplementadas con ácidos grasos poliinsaturados, las cuales han tenido un efecto positivo sobre el crecimiento de las camadas de madres suplementadas, con la obtención de canales de conejo con un perfil lipídico saludable, a la vez que mejoran las respuestas endocrinas y metabólicas de las madres durante su primer ciclo productivo. Por otro lado, el uso de dietas altas en fibra (Rebollar *et al.*, 2011), ha mostrado mejoras en los niveles de energía con los que enfrentan las hembras nulíparas el inicio de su vida productiva, gracias a su efecto sobre el desarrollo del tracto digestivo y su baja energía digestible, que evita la acumulación excesiva de depósitos grasos contraproducentes en este periodo. En vista de la importancia de una condición corporal óptima y uniforme de las hembras (sin exceso o déficit de depósitos grasos) para conseguir una respuesta hipofisaria adecuada en términos de secreción de FSH y LH, también se han estudiado diferentes estrategias alimentarias con una reducción controlada de la ingesta durante la gestación (Rodríguez *et al.,*2017b), en este caso con el objetivo de optimizar el ciclo productivo de manera sostenible y beneficiosa para el productor, ya que como se ha visto anteriormente, el uso más extendido de la especie se encuentra dentro del sector ganadero. En este estudio se recogieron los primeros resultados que indicaban una modulación del empleo de recursos energéticos durante la gestación como respuesta a la disponibilidad de alimento, para garantizar la supervivencia y el correcto desarrollo de los fetos entre distintos grupos experimentales estudiados, así como una compensación en el consumo voluntario en los periodos inmediatamente posteriores al ajuste de la ración, pero que al finalizar el experimento reportó una reducción de los costes respecto al grupo control (sin ajuste de ración).

De esta manera y gracias a trabajos posteriores, se constató el potencial del conejo como modelo animal para el estudio de la competición materno-fetal por los recursos energéticos durante la gestación en casos de malnutrición materna, ahondando en el denominado "crecimiento intrauterino restringido" (López Tello *et al.,*2017), así como las consecuencias que esta malnutrición de la hembra gestante puede tener en el estado de salud general de las siguientes generaciones debido a

alteraciones epigenéticas derivadas del desarrollo fetal bajo una nutrición deficiente (García-García *et al.*, 2021a). Ambas condiciones son fenómenos que se dan en medicina humana y que tienen consecuencias en la salud de la población de países en vías de desarrollo a nivel global.

En la línea del control de la ración y su demostrado ahorro en costes de producción, y en vista de la controversia que puede generar hoy la industria ganadera en relación a las tendencias actuales en cuanto a elecciones de alimentación, parte del objetivo de este trabajo es corroborar mediante los conocimientos adquiridos hasta ahora, si las estrategias aplicadas con el objetivo de mejorar la producción cunícola, son capaces de no sobrepasar la capacidad de adaptación de esta especie en cuanto a su metabolismo y aprovechamiento de los recursos energéticos procedentes de la dieta. Además, los resultados pueden ayudar a determinar dónde se encuentra la línea que define el equilibrio entre el mantenimiento de los procesos fisiológicos que benefician y mantienen la producción animal y hasta dónde se puede llegar sin comprometer la salud y el bienestar de los animales en el proceso.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El propósito general de esta Tesis Doctoral es poner en valor las aplicaciones prácticas de conocer los procesos reproductivos y metabólicos desde un punto de vista fisiológico y endocrino, para que este conocimiento pueda ser trasladado a la práctica en el sector cunícola. De esta manera, se puede respaldar científicamente la aplicación tanto de ciertas técnicas de manejo que son habituales en las granjas (concretamente en esta Tesis se abordan los ajustes del tamaño de camada, pero existen otros como los ritmos de inseminación semi-intensivos, inducción de la ovulación por medios exógenos, que han quedado fuera de esta Tesis para evitar sobredimensionar las áreas de estudio), como el uso de algunas estrategias alimentarias (reducción o aumento en la cantidad de alimento aportado en determinados momentos del ciclo productivo, objeto de estudio fundamental en el desarrollo de esta Tesis), que pueden suponer un mayor margen de beneficio para el productor.

Además, profundizar en la homeostasis de la gestación y el desarrollo fetoplacentario del conejo bajo estas condiciones, ha mostrado ser una herramienta para considerar esta especie como modelo animal frente a problemas crónicos de salud humana que tienen su origen en una nutrición deficiente de la madre en el periodo de gestación. Por ello, estos estudios no tienen solamente interés productivo para la industria ganadera, sino también a nivel traslacional en medicina humana y salud global.

Por último, en la actualidad, el público medio y los consumidores se encuentran cada vez más concienciados con la ética y el bienestar de los animales en todos los ámbitos de la sociedad, especialmente en materia de producción de alimentos de origen animal, por lo que este tipo de estudios pueden enfocarse en aportar transparencia y tranquilidad en este sentido, mostrando en profundidad el funcionamiento del proceso, aportando datos científicos cuantificables, y con el potencial de constatar que la capacidad de los animales no se ve sobrepasada por los beneficios económicos que pueden derivar de su empleo en producción, siendo esa una forma de velar por el bienestar de los mismos.

Para la consecución de este objetivo general, por lo tanto, se marcaron dos objetivos específicos:

Objetivo 1: Determinar los posibles efectos del tamaño de camada en conejas primíparas, empleando los ajustes de número de gazapos más frecuentes en producción cunícola, sobre los procesos hormonales implicados en la reproducción (calidad de la ovulación, niveles de progesterona y secreción de prolactina para mantener la lactación) y sobre los parámetros productivos de la segunda gestación (número y viabilidad de los gazapos, desarrollo y crecimiento durante la lactación y fase de cebo, y la capacidad de las madres para quedar gestantes de nuevo).

Objetivo 2: Evaluar las consecuencias a corto y largo plazo de un ajuste de ración o restricción de alimento durante la segunda gestación de las conejas, en diferentes momentos y con duraciones distintas, sobre la gestión del metabolismo energético y movilización de reservas de las madres, el desarrollo fetoplacentario de los gazapos, su crecimiento durante la lactación, y si esta práctica conlleva alguna alteración metabólica que pueda ser indicativo de estrés o malestar en las madres sobre las que se aplican estas estrategias, además de evaluar el potencial beneficio para el ganadero que implemente estas prácticas.

3. EXPERIMENTO 1: ESTUDIO DEL EFECTO DEL TAMAÑO DE CAMADA SOBRE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE LAS HORMONAS HIPOFISARIAS Y OVÁRICAS DE CONEJAS PRIMÍPARAS DURANTE LA LACTACIÓN.

1. INTRODUCCIÓN

La lactación es un periodo crítico en la producción cunícola, ya que la futura viabilidad y el rendimiento productivo de los gazapos se relacionan directamente con la ingesta de leche en las primeras semanas de vida (Lebas, 1972). El comportamiento maternal en las conejas comienza antes del parto con la bajada de la progesterona (P_4) y la subida del estradiol (E_2), junto con la secreción de oxitocina y PRL (McNeilly y Friessen, 1978). Hudson y Distel (1989) documentaron que las pautas de amamantamiento de las conejas tienen una periodicidad circadiana y que éste ocurre principalmente entre la medianoche y las 4:00 a.m., dependiendo del umbral de estimulación que produce la succión de los gazapos (González-Mariscal *et al.*, 2013). Los ritmos circadianos de las hembras y de sus camadas están sincronizados, de tal manera que la temperatura corporal de los gazapos aumenta justo antes del amamantamiento, siendo capaces de anticipar la llegada de la coneja y de aumentar su actividad para prepararse para la competencia que supone el amamantamiento (Jilge *et al.*, 2000). Las madres secretan grandes concentraciones de oxitocina y PRL como consecuencia de la succión y, por lo tanto, la producción de leche se ve afectada por los niveles hormonales maternos inducidos por esta succión (Freeman *et al.*, 2000), cuya magnitud puede variar dependiendo del número de gazapos lactantes.

Los programas de selección genética enfocados a la mejora reproductiva han mejorado la prolificidad obtenida por inseminación artificial (IA) en hembras empleadas en granjas comerciales (Pascual *et al.*, 2013). Las conejas han incrementado su capacidad para aprovechar sus reservas corporales garantizando la nutrición de la descendencia, aunque pueden verse afectadas por cambios metabólicos e inflamatorios durante la lactación (Minuti *et al.*, 2015). Al tener la hembra solamente 10 glándulas mamarias, una práctica común en las granjas de cunicultura es la adopción de gazapos entre las diferentes hembras en producción para homogeneizar los tamaños de camada. Este procedimiento es necesario para aliviar la carga metabólica que suponen camadas demasiado grandes para las hembras más prolíficas (Lebas *et al.*, 1991); para reducir la mortalidad de los gazapos, sobre todo aquellos con un menor peso al nacimiento en camadas muy grandes (Szendrö y Maertens, 2001); y para conseguir pesos al sacrificio más homogéneos (Arrington y Kelley, 1984). Normalmente, incluso en granjas no comerciales, las camadas se pueden homogeneizar y ajustar diferentes números si es necesario, siendo lo más habitual rangos entre 7 y 9 gazapos (González-Redondo *et* al., 2010) o entre 10 y 11 gazapos (Rodríguez *et al.*, 2018).

Además, la lactación es un periodo extremadamente demandante a nivel fisiológico para las hembras (Castellini, 2007), y en especial para las primíparas. La capacidad de ingesta de estas hembras frente a las multíparas es menor, generando un balance energético negativo en la primera lactación que provoca un

aumento de la tasa de reposición (Xiccato, 1996). La aplicación de ritmos intensivos o semi-intensivos de reproducción (IA a 4 dpp o 11 dpp, respectivamente) sobre estas hembras hacen imposible que se puedan cubrir las necesidades de lactación y de crecimiento de forma simultánea (Castellini *et al.*, 2003; Rebollar *et al.*, 2006), por lo que en estudios previos se ha optado por emplear ritmos reproductivos extensivos (IA después del destete) en conejas primíparas (Arias-Álvarez *et al.*, 2009; Rebollar *et al.*, 2009). En estos estudios se ha observado que el uso de estos ritmos extensivos con IA tras el destete de la primera camada, mejoran considerablemente la condición corporal (CC) de las primíparas, logrando así un estado metabólico óptimo para afrontar los siguientes ciclos productivos.

Las concentraciones de hormonas reproductivas representativas como la PRL, la LH y el E2, han sido descritas durante la cubrición (Ubilla *et al.*, 2000a) y en hembras lactantes (González-Mariscal *et al.*, 1994; Ubilla and Rebollar, 1995; Ubilla *et al.*, 2000b). Además, las concentraciones de P4 han sido descritas en ciertos periodos de la gestación (Ubilla *et al.*, 1992); Rodríguez *et al.*, 2018), y durante la gestación y la lactación (González-Mariscal *et al.*, 1994). Las concentraciones plasmáticas de PRL durante la cubrición pueden afectar a la tasa de ovulación (TO) de las hembras, y aquellas con una TO>15 de cuerpos lúteos (CL) tienen menores concentraciones de PRL y mayores concentraciones de LH que aquellas con un RO≤15 (Muelas *et al.*, 2008). Sin embargo, no se ha estudiado apenas si esta respuesta hipofisaria podría sufrir cambios en hembras lactantes de líneas hiperprolíficas con prolificidades mayores o menos a los 10 gazapos. Por otro lado, se debe tener en cuenta que aunque la función fisiológica principal de la PRL es la síntesis de leche y el desarrollo del tejido mamario, esta hormona es pleiotrófica e interviene en una gran variedad de procesos, por lo que la hipófisis no es el único lugar donde se produce su secreción, sino que también puede secretarse en el sistema nervioso central, el sistema inmunitario, el útero y sus tejidos asociados durante la fecundación, e incluso en la propia glándula mamaria (revisión por Freeman *et al.*, 2000). Esto implica que la liberación de PRL puede atribuirse a un variado número de estímulos además de la succión de los gazapos, como pueden ser la intensidad de la luz, las variaciones en la duración del día en mamíferos con reproducción estacional, sonidos, estímulos olfativos y estrés.

Por todo esto, el objetivo del experimento fue el estudio de la influencia del tamaño de camada (TC; 7-9 gazapos vs. 10-12 gazapos) sobre las concentraciones plasmáticas de prolactina (PRL) antes y después del amamantamiento, así como tras el destete; las concentraciones plasmáticas de hormona luteinizante (LH) y progesterona (P4) tras la inducción de la ovulación y después del destete; y por último los parámetros productivos del segundo ciclo de estas hembras.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon conejas Neozelandés Blanco x California de la línea A de la Universidad Politécnica de Valencia (n=50), seleccionadas por tamaño de camada al destete (Baselga et al., 1984; Estany et al., 1989), alimetadas *ad libitum* con dieta comercial (2400 kcal ED/kg, 35% FND and 16% PC, 3.7% GB; NANTA, Madrid, España) durante todo el estudio (Figura 1). Tras el primer parto, las hembras se distribuyeron en dos grupos experimentales atendiendo a un ajuste de la densidad de camada de la siguiente forma:

- **Grupo HL** (alta densidad de camada; n=21): hembras con una prolificidad en el primer parto de 11,80±0,33 nacidos vivos, 0,19±0,99 nacidos muertos y un peso de camada de 527,90±17,70g, cuyo tamaño de camada se ajustó a 10-12 gazapos.
- **Grupo LL** (baja densidad de camada; n=29): hembras con una prolificidad en el primer parto de 9,10±0,45 nacidos vivos, 0,34±0,10 nacidos muertos y un peso de camada de 430,90±18,60g, cuyo tamaño de camada se ajustó a 7-9 gazapos.

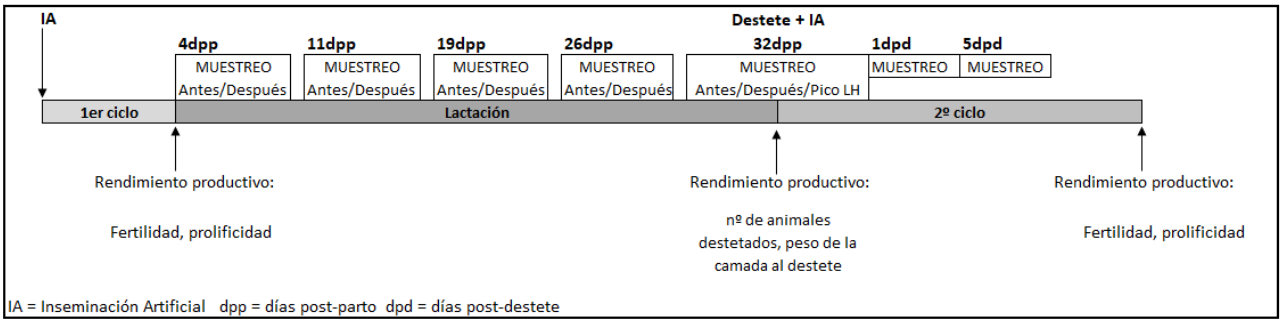


Figura 1: Diseño experimental, experimento 1. Cronograma de toma de muestras.

Las hembras y las camadas se revisaron diariamente, registrando el número de hembras o gazapos muertos durante el periodo de lactación y el peso de la camada al destete.

2.1 Toma de muestras y estudio hormonal:

Durante la lactación, en una submuestra aleatoria de 12 animales (6 del grupo HL y 6 del grupo LL), se tomaron muestras de la arteria central de la oreja (Imagen 2; 2,5 ml) antes y después del amamantamiento, retirando la madre de la jaula e inmovilizándola en un cepo de tela y empleando agujas de 23G. Se muestreó a los animales semanalmente los días 4, 11, 19, 26 y 32 post parto. Para ello, los nidos acoplados a las jaulas de estabulación se cerraban durante la noche para permitir el muestreo a primera hora de la mañana antes del amamantamiento, y se abrían después de la primera toma de muestras para permitir el contacto entre la

madre y los gazapos. A partir del día 26 de lactación, debido al tamaño de los gazapos y a la dificultad para mantenerlos separados de la madre mediante los nidos, las camadas se alojaron en jaulas contiguas a éstas, separando a la madre la noche anterior a la toma de muestras programada, e introduciéndola de nuevo para permitir el amamantamiento tras la toma de la primera muestra.

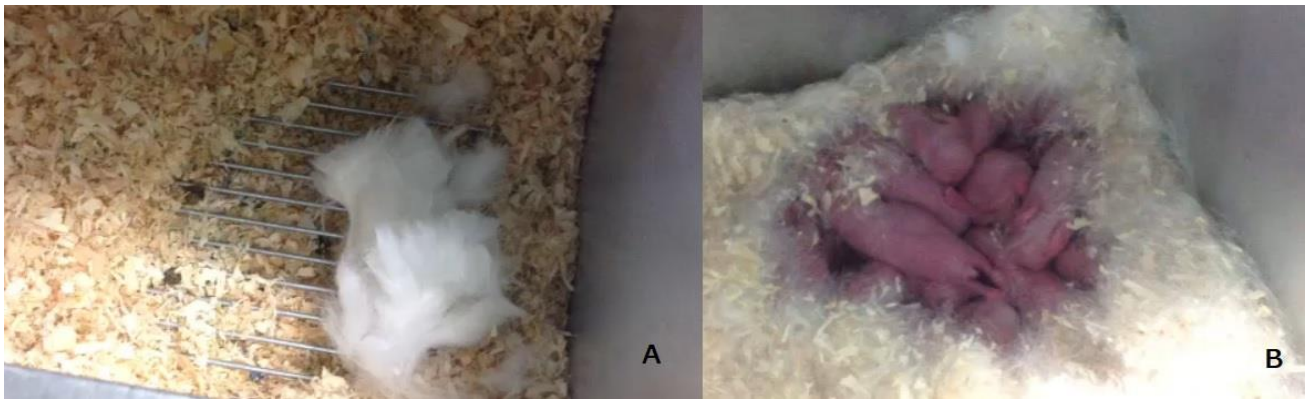
Tomando como referencia estudios previos (Fuchs et al., 1984 y Ubilla et al., 2000a) que indican que las concentraciones plasmáticas de PRL no llegan a valores máximos hasta pasados 1-5min del amamantamiento, este fue el tiempo aproximado que estimamos entre el inicio del contacto entre madre y camada y la salida voluntaria de la madre del nido tras dar de mamar a los gazapos, y, por tanto, el momento en el que se obtuvo la segunda muestra repitiendo la técnica anterior. Para evitar variaciones en el tamaño de la camada de estos 6 animales por grupo, los gazapos encontrados muertos durante el experimento fueron sustituidos por otros de la misma edad procedentes de conejas de la misma granja.

Imagen 3: Toma de muestras de la arteria central de la oreja con EDTA como anticoagulante.

Fuente: Rodríguez, M. UPM, 2016.

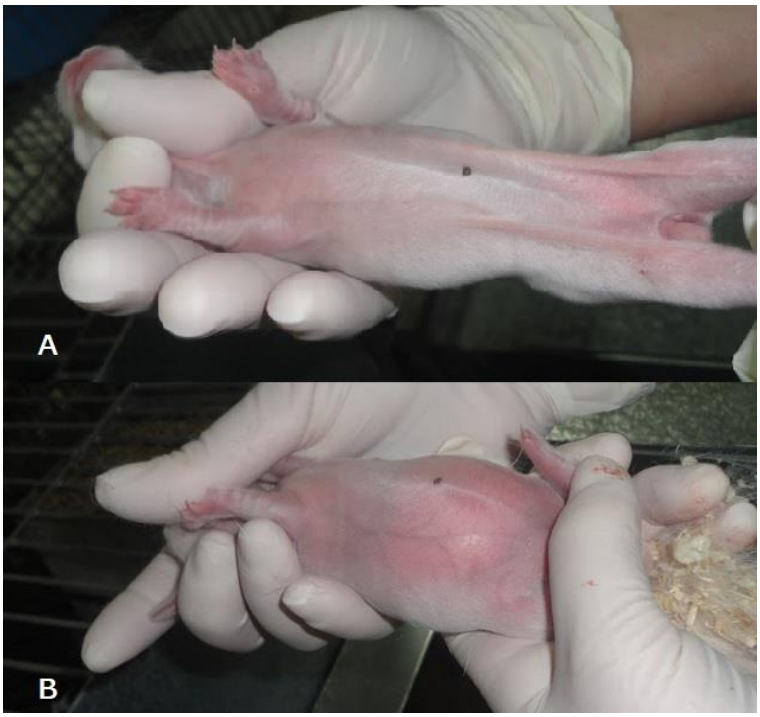
El día 32 post-parto se llevó a cabo el destete de los gazapos, e inmediatamente después, las hembras fueron inseminadas artificialmente (IA) con semen fresco diluido (MA 24, Ovejero, León, España) y se indujo la ovulación mediante inyección intramuscular de gonadorelina (20µg/hembra; Inducel-GnRH, Ovejero, León, España). Cada dosis seminal contenía al menos 20 millones de espermatozoides en 0.5ml de diluyente seminal. En este momento, se tomaron muestras de sangre a 0 y 60 minutos post IA en las mismas 12 hembras en las que se llevó a cabo el seguimiento de la lactación (6 HL y 6 LL) para determinar el pico de LH en plasma según el método descrito por Rebollar et al., (2012), desarrollado y validado en el laboratorio del Dpto. de Fisiología Animal UCM, y la concentración plasmática de P4 mediante el uso de un kit comercial (Demeditec Diagnostics GmbH, Alemania). Posteriormente, las mismas hembras se muestrearon los días 1 y 5 post destete o post IA para medir las concentraciones plasmáticas de PRL.

Todas las muestras de sangre recogidas se centrifugaron a 1200g durante 10 minutos a 4ºC y se obtuvo el plasma sanguíneo, que se almacenó a -20ºC hasta su análisis.



Imágenes 4 A-B: (A) Nidificación. **(B)** Gazapos recién nacidos. Fuente: Rebollar PG, Rodríguez M. UPM. 2016

Durante todo el estudio, las concentraciones plasmáticas de PRL se determinaron usando un kit comercial de inmunoensayo (Rabbit PRL CEA846Rb, Cloud-Clone Corp, CCC, EEUU), con un rango de detección de 2,47 ng/ml a 200 ng/ml, sensibilidad del ensayo 0,92 nl/ml, y coeficiente de variación inter ensayo (CV) 7,2%. En el caso de la LH y la P4, los rangos de detección fueron de 5 a 125 ng/ml y de 0,3 a 40 ng/ml, con sensibilidad de la prueba de 0,78 ng/ml y 0.045 ng/ml y coeficiente de variación inter e intra ensayo de 5,9% y 5,7% respectivamente.



Imágenes 5 A-B: Gazapos de 2 semanas antes (A) y después (B) de ser amamantados. Fuente: Fernández-Pacheco, C. UCM. 2016.

Imagen 6: Gazapos al destete. Fuente: Fernández-Pacheco C. UCM. 2016.

2.2 Estudio productivo:

Tras el segundo parto, se registraron los siguientes parámetros productivos en ambos grupos experimentales para compararlos con los del ciclo anterior: fertilidad ([nº hembras gestantes / nº de hembras inseminadas] x 100), prolificidad (nacidos vivos y nacidos muertos), tamaño de camada y peso de la camada al destete.

Imágenes 7 A-B: Pesajes de camadas a diferentes días de lactación.

Fuente: Rebollar, UPM; Fernández-Pacheco, C. UCM. 2016

2.3 Análisis estadístico:

Para el análisis estadístico de los resultados, se usó el software SAS (Statistical Analysis System Institue Inc; Cary, NC, USA, 2001), tomando como unidad experimental la coneja. Los parámetros productivos al final de la primera lactación (gazapos destetados, peso de la camada y mortalidad) se analizaron considerando el ajuste del tamaño de camada (HL y LL) como el efecto principal. Para el estudio de las concentraciones plasmáticas de PRL, se llevó a cabo un análisis de medidas repetidas de la varianza, considerando como efectos principales el tratamiento (tamaño de camada), el tiempo (antes y después de amamantar en los días 4, 11, 19, 26 y 32 de lactación, y los días 1 y 5 post destete) y la interacción entre ambos. El análisis de los parámetros productivos del segundo ciclo se hizo tomando como efecto principal el tamaño de camada de la lactación anterior. En el caso de encontrar diferencias estadísticamente significativas, las medias se compararon con una T de Student, siendo el valor de P a considerar para las diferencias estadísticamente significativas <0,05.

3. RESULTADOS

3.1 Resultados productivos:

Como resultado del ajuste de camadas, al final de la primera lactación el grupo HL destetó mayor número de gazapos que el grupo LL (11,22±0,21 y 7,55±0,39 gazapos, respectivamente; p<0,0001), con mayor peso de camada (PC) (6294±155g y 4655±251g, respectivamente; p<0,0001), pero con gazapos más ligeros (560,1±15,4g y 637,5±25,9g, respectivamente; p=0,024). Las ratios de mortalidad de los gazapos al final del estudio fueron 4,5 y 12,5% (p=0,037) en los grupos HL y LL respectivamente. Además, tres conejas del grupo HL y una del grupo LL murieron durante el experimento.

Los resultados productivos del segundo ciclo de acuerdo con el TC en la primera lactación, se muestran en la Tabla 1. El TC no supuso diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ninguno de los parámetros productivos registrados en el segundo parto.

Tabla 1. Rendimiento productivo (media ± SEM) en el segundo ciclo de conejas con densidad de camada alta (HL: 10-12 gazapos) y densidad de camada baja (LL: 7-9 gazapos) durante su primera lactación e inseminadas tras el destete.

	HL	LL	p-valor
n	21	29	
Fertilidad (%)	66.70±11.29	67.90±9.060	0.9348
Prolificidad			
N. vivos	12.64±0.73	11.44±0.61	0.2177
N. muertos	0.00±0.37	0.81±0.31	0.1068
Destetados	10.64±0.61	10.40±0.51	0.7442
P. camada (g)			
Al parto	786.93±43.72	702.70±36.25	0.1506
Al destete	7562±443.55	7086±350.65	0.4079
Mortalidad[1] (%)	19.05±7.74	10.71±6.71	0.4200

[1]: *Porcentaje de gazapos muertos por camada.*

3.2 Resultados hormonales:

La interacción de los dos efectos estudiados (TC y tiempo) sobre la PRL se muestran en la Figura 2. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas durante la lactación relacionadas con las concentraciones de PRL antes e inmediatamente después del amamantamiento (p=0,2520), y el TC tampoco afectó a las concentraciones plasmáticas de PRL de las conejas (p=0,7977).

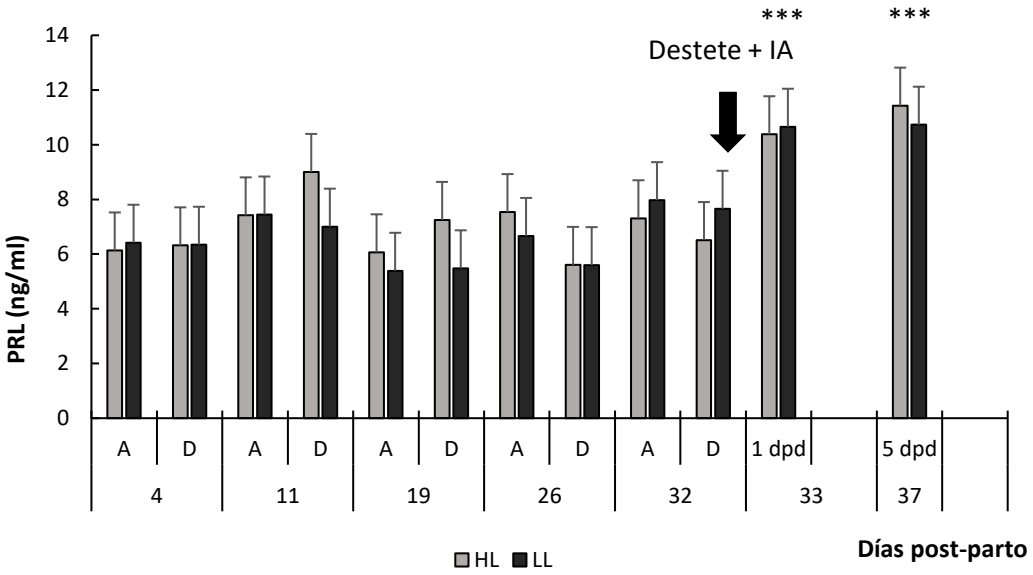
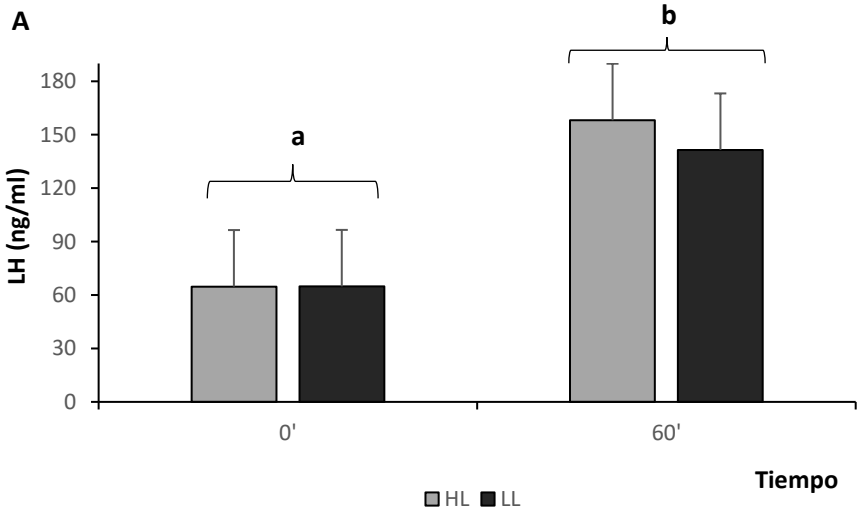


Figura 2: Concentraciones plasmáticas de prolactina (PRL) antes (A) y después (D) del amamantamiento de conejas primíparas lactantes con alta densidad de camada (HL, 10-12 gazapos; n=6) y baja densidad de camada (LL, 7-9 gazapos; n= 6). IA: Inseminación Artificial; dpd= días post-destete. ***: *P*=0.0003.

Por otro lado, se detectaron diferencias estadísticamente significativas relacionadas con el tiempo (p=0,0003) en los días 1 y5 pp, donde las concentraciones de PRL de las madres aumentaron respecto a las del periodo pre-destete.

El TC no afectó a las concentraciones plasmáticas de LH (p=0,9948) ni a las de P4 (p=0,8600), pero sí que hubo diferencias estadísticamente significativas relacionadas con el momento de la toma de muestras (0 y 60 minutos post-IA) en ambas hormonas (LH; p=0,0383 y P4; p=0,0138, respectivamente). Estos resultados se muestran en las Figuras 3A y 3B.



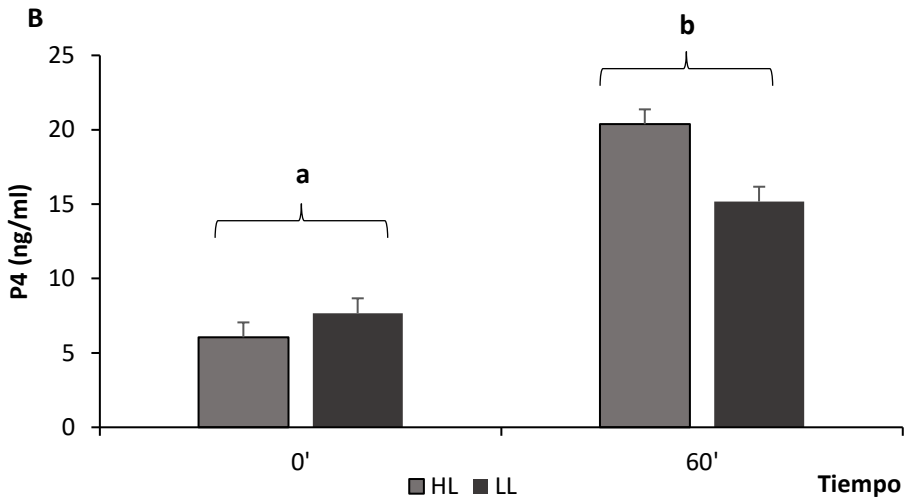


Figura 3: A) Hormona luteinizante (LH) y **B)** progesterona (P4) plasmáticas 0 y 60 min después de la IA de conejas con 10-12 gazapos (HL; n=6) y con 7-9 gazapos (LL; n=6) en su primera lactación. Las letras a,b indican diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos 0 y 60′ (P<0.05). HL: alta densidad de camada (10-12 gazapos). LL: baja densidad de camada (7-9 gazapos).

4. DISCUSIÓN

De acuerdo con el diseño experimental, las diferencias entre el TC y peso de camada fueron debidas al ajuste de camada realizado al inicio de la lactación. La mortalidad de gazapos durante la lactación fue mayor en el grupo LL que en el grupo HL, a pesar de que cabría esperar que el grupo LL, al haber menos animales por camada y existir menos competencia entre ellos, los gazapos habrían tenido mejor acceso a los recursos para alimentarse. Sin embargo, la explicación se puede encontrar en los hallazgos de Poigner *et al.* (2000), que determinaron que pesos al nacimiento más heterogéneos dentro de la misma camada pueden influir en la tasa de mortalidad de los gazapos durante la lactación. Teniendo esto en cuenta, se observó que previamente al ajuste del TC, la media ± la desviación estándar del peso al nacimiento de los gazapos del grupo HL fue de 45,2±6,86g frente a 49,1±9,48g del grupo LL. Esto implica que, en este estudio, al no considerar también la homogeneización de los pesos de los gazapos dentro de la camada junto con el TC, la tasa de mortalidad se pudo haber visto afectada y presentar diferencias entre grupos no intencionadas, ya que la diferencia entre los pesos de los gazapos al nacimiento del grupo LL fueron mayores que en el grupo HL.

Además, hay que resaltar que, aunque en este experimento las diferencias en el tamaño de camada fueron intencionadas por determinarse durante el diseño experimental, el TC en sí mismo es un parámetro con elevada variabilidad dentro de esta especie (Argente *et al.*, 2019; Blasco *et al.*¸2017), por lo que encontrar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos supone una complicación a no ser que se emplee un tamaño muestral muy elevado. Por ello, y considerando la posibilidad de que el tamaño muestral

de este experimento pueda haber sido insuficiente, habría que considerar explorar el efecto del ajuste del TC sobre la productividad posterior con un experimento adecuadamente dimensionado para evaluar de forma más rigurosa el efecto de este parámetro.

En cuanto a la tasa de mortalidad en las madres, pudo estar asociada a enfermedades metabólicas subyacentes o no detectadas. Minuti *et al.* (2015) estudiaron el estado metabólico y bioquímico de hembras seleccionadas por su elevada prolificidad, comparando dos grupos de acuerdo con el tamaño de camada (con >10 o <10 gazapos) y observaron diferencias evidentes entre ellos antes del parto, aunque estas desaparecían a los 4 y 12 dpp. Otros autores (Xiccato *et al.*, 1996; Mocé *et al.*, 2000) describieron que la depleción de energía de las conejas puede llevar a enfermedades hepáticas y toxemia gestacional cuando se solapan la gestación y la lactación. Aunque no fue éste el caso de nuestro estudio, ya que las hembras solamente se encontraban lactantes, un balance energético negativo con una consecuente enfermedad metabólica podría explicar las bajas sufridas en el grupo HL, que fue probablemente el grupo con mayor demanda metabólica. Las conejas primíparas experimentan un balance energético complejo entre los días 25 de gestación y el tercer día de lactación (Xiccato y Trocino, 2010), que en animales sanos debería recuperarse completamente alrededor del día 4 pp (de la Fuente y Rosell, 2012). Teniendo en cuenta que las muertes de las hembras ocurrieron después del destete en el grupo HL, se podría asumir que existían enfermedades subyacentes que pasaron inadvertidas e impidieron a las hembras recuperar completamente su condición corporal y su balance energético durante la lactación.

Los resultados obtenidos en cuanto a las concentraciones de PRL, confirman que las conejas de líneas prolíficas tienen una respuesta hipofisaria similar inmediatamente después del amamantamiento, ya sea con un TC de 7-9 gazapos o con uno de 10-12 gazapos. Rebollar *et al.* (2008) determinaron concentraciones similares de PRL empleando la separación transitoria de la camada 24h antes de la IA. En este experimento no parece modificarse la secreción hipofisaria de PRL, ni la aparente sincronía entre la hembra y la camada. Además, Fuchs *et al.* (1984) ya determinaron que mientras que los niveles de oxitocina aumentan muy rápidamente durante el amamantamiento y descienden a niveles basales muy poco tiempo después, que el aumento plasmático de PRL se retrasa hasta 1-5 minutos después de que termine el estímulo de succión al principio de la lactación y que, a mitad de ésta, la PRL alcanza niveles máximos que se mantienen durante 2-3h. A pesar de que en este experimento la toma de muestras se planificó y aplicó siguiendo esta premisa, no fue posible determinar este incremento de PRL plasmática citados por Fuchs *et al.* (1984) y solamente se determinaron los niveles basales. Por lo tanto, sería necesario emprender más estudios en los que la toma de muestras se lleve a cabo más tarde tras el amamantamiento, para así poder determinar las diferencias existentes en la respuesta de las madres a diferentes TC.

En cuanto al incremento plasmático de PRL detectado después del destete y que implica significación estadística (P=0,0003), si las hembras hubieran estado gestantes en ese momento (en el caso de que la IA se hubiera hecho tras el parto), la producción de leche habría cesado abruptamente el día 26 de lactación, y las hembras habrían dejado de entrar en el nido (Lincoln, 1974). Sin embargo, en este estudio, la lactación y la gestación no fueron simultáneas, conllevando esto la continuidad del comportamiento maternal hasta el día 32 pp. De acuerdo con González-Mariscal *et al.* (2016), la conducta maternal continúa hasta el día 40 pp si el estímulo de succión sigue presente. Por otro lado, se sabe que la PRL juega un papel en las situaciones de estrés (Seggie y Brown, 1975; Kant *et al.*, 1983), por lo que, si se considera que en este estudio el destete se realiza el día 32 pp, y que Argente *et al.* (2014) describieron concentraciones elevadas de cortisol en hembras hacia el final de la lactación como un indicador de estrés, la elevación de la PRL los días 33 pp y 37 pp podría ser una consecuencia debida a factores estresantes.

El pico preovulatorio de LH y las concentraciones de P4 determinadas después de la IA fueron similares a los descritos en experimentos previos (Rebollar *et al.*, 2012, 2014). La realización de la IA post-destete en hembras primíparas, como sugieren ensayos previos (Arias-Álvarez *et al.*, 2009), logra por lo tanto obtener un rendimiento productivo satisfactorio en estas hembras primíparas de líneas prolíficas, similar al descrito en trabajos anteriores (Rebollar *et al.*, 2008).

5. CONCLUSIONES

Como conclusión, estos resultados sugieren que el estímulo de succión producido por camadas de 7-9 gazapos o de 10-12 gazapos en hembras primíparas de líneas genéticas seleccionadas por su elevada prolificidad durante la primera lactación, tiene las mismas implicaciones en las concentraciones plasmáticas de LH y P4 durante la ovulación y en el rendimiento productivo en el segundo ciclo. No obstante, para detectar un estímulo efectivo producido por la succión de los gazapos y evaluar si las diferencias entre el TC están relacionadas (o no) con diferencias estadísticamente significativas en la secreción de PRL, serían necesarios tiempos de muestreo más diferidos tras el amamantamiento (>5 minutos). La principal clave para un rendimiento productivo satisfactorio radica en la aplicación de un ritmo de producción extensivo que se ajuste a las necesidades energéticas de recuperación y la situación fisiológica de las hembras primíparas lactantes de líneas prolíficas.

4. EXPERIMENTO 2: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE DIFERENTES PAUTAS DE RESTRICCIÓN MODERADA DE ALIMENTO DURANTE LA GESTACIÓN DE HEMBRAS PRIMÍPARAS EN LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA A LARGO PLAZO, EL RENDIMIENTO PRODUCTIVO Y BIENESTAR.

1. INTRODUCCIÓN

En las granjas cunícolas, la alimentación de las hembras reproductoras representa alrededor de un tercio de los costes totales de alimentación (3,7% y 31,7% en referencia a hembras de reposición y de reproducción, respectivamente) (Cartuche *et al.*, 2014). Además, el número de gazapos nacidos vivos y el índice de conversión durante el engorde (IC) tienen una elevada importancia económica, siendo factores que dependen directamente de la nutrición materna durante la gestación y la lactación. La IA de las hembras suele llevarse a cabo a los 4dpp o los 11dpp, mientras que las hembras se encuentran lactantes, dándose gestaciones y lactaciones simultáneas (Theau-Clément *et al.*, 2007). Existen estrategias de producción alternativas encaminadas a mitigar el desgaste energético que esto supone para las hembras reproductoras tras su primera gestación, lo cual es muy necesario debido a que éstas aún no han terminado de completar su propio desarrollo (Fortum-Lamothe *et al.*, 2000). Una de estas estrategias es retrasar el intervalo entre el primer parto y la segunda IA hasta el destete (día 30pp), aplicando un ritmo reproductivo extensivo (Arias-Álvarez *et al.*, 2009). Esto mejora el rendimiento productivo (Sakr *et al.*, 2012), pero teniendo en cuenta que las primeras semanas de gestación se consideran un periodo anabólico (Partridge *et al.*, 1986a; Bauman y Currie, 1980) y no suponen un gasto energético muy elevado, existe un mayor riesgo de que las hembras alimentadas *ad libitum* en este periodo (realizando la IA post-destete) acumulen un exceso de depósitos grasos, fenómeno que denominamos "de engrasamiento". Sin embargo, sigue tratándose de una fase crítica que puede influir sobre la tasa de implantación embrionaria y el desarrollo de la placenta, ambos factores limitantes en relación al crecimiento fetal. De hecho, este riesgo de engrasamiento aumenta aún más si las hembras inseminadas no quedan gestantes (el diagnóstico de gestación se realiza normalmente a los 10-14 días post-IA), por lo que las estrategias de alimentación como objeto de estudio en estos animales incluyen la aplicación de diferentes niveles de Restricción de Alimento Materna (RAM) durante diferentes periodos de la gestación.

La RAM ha tenido diversas finalidades: evitar el engrasamiento y reducir la mortalidad periparto (Rommers *et al.*, 2001), determinar la competencia materno-fetal por los recursos energéticos (López-Tello *et al.*, 2017), incrementar el consumo voluntario de alimento al inicio de la lactación, o alargar la vida reproductiva de las hembras reproductoras (Partridge *et al.*, 1986b). López-Tello *et al.*, (2017, 2016) verificaron que la desnutrición en hembras (RAM del 50%) durante toda la gestación o durante el periodo preimplantacional (primera semana de gestación), tuvo efectos adversos sobre la unidad fetoplacental, como una reducción de la longitud corporal de los fetos, un crecimiento asimétrico y elevadas tasas de apoptosis en la decidua y el laberinto. En relación a esto, también se ha descrito que, si el aporte diario de alimento se reduce al 60% del consumo voluntario total de la hembra, los efectos negativos solamente se observan en la segunda mitad de la gestación. Por otro lado, si la RAM se aplica en los primeros 15 días de gestación, no se aprecian efectos

adversos en la viabilidad o el peso al nacimiento de los gazapos (Nafeaa *et al.*, 2011). Asimismo, la realimentación *ad libitum* en el último tercio de la gestación ha demostrado mejorar el estado energético de las madres antes del parto (Manal *et al.*, 2010), momento en el cual las necesidades fetales son mayores. También se reducen los efectos negativos de la subsiguiente lactación en la función reproductiva como son una mala respuesta ovulatoria y un mayor intervalo entre el parto y una IA fértil, además de aumentar el peso y mejorar la viabilidad de los gazapos.

Lo que se conoce de la aplicación de una RAM se basa principalmente en estudios experimentales previos (García-García *et al.*, 2021a, 2021b), en los cuales se han descrito las consecuencias metabólicas observadas en las hembras reproductoras y en su descendencia al haber estado las madres sujetas a una RAM del 60% durante 3 semanas de gestación (desde el día 0 al 21 de gestación). Esta RAM conllevó un consumo de alimento compensatorio en la última semana de gestación que contrarrestó los efectos en el peso vivo (PV) y en las reservas corporales de las hembras en el momento del parto, así como en el peso fetal y en el fenotipo a día 28 de gestación. Estos estudios sobre RAM aplicada en las 3 primeras semanas de gestación se han centrado en comparaciones muy específicas entre los perfiles metabólicos de las madres y los fetos en un momento muy concreto de la gestación, que es el día 28.

Por esto, con el fin de llegar a un mejor entendimiento de los cambios metabólicos y las modulaciones energéticas que acontecen en hembras primíparas sometidas a una RAM, lo novedoso de este experimento fue la aplicación de periodos de RAM más cortos y más específicos a lo largo de la gestación para estudiar las consecuencias a largo plazo y añadiendo nuevas hormonas y metabolitos. Entre otras, las hormonas tiroideas son clave en la regulación del metabolismo y en la adaptación al ayuno, y contribuyen a la termogénesis tanto preceptiva como adaptativa, regulando el apetito y el gasto de energía (Mullur *et al.*, 2014). Por otro lado, la glucosa es el elemento central a la hora de hablar de gasto energético: los carbohidratos, los lípidos y las proteínas en última instancia se transforman en glucosa, que sirve como la principal fuente de energía para las células en los mamíferos y la fuente energética preferente en los fetos (Nakrani *et al.*, 2020). De igual forma, la insulina es la hormona anabólica por excelencia, secretada por aumento de los niveles de glucosa y aminoácidos en sangre tras la ingesta de alimento. La principal acción de la insulina es estimular y controlar el consumo y uso de glucosa a nivel metabólico. Igual que otras hormonas, la insulina ejerce su función uniéndose a receptores específicos presentes en numerosas células distribuidas por el organismo (Aronoff *et al.*, 2004). Junto con esto, la concentración ácidos grasos no esterificados (NEFA) reflejan la movilización de reservas corporales al derivar de la lipólisis del tejido graso, siendo indicadores de un balance energético negativo (Emery *et al.*, 1992).

Las reservas de ácidos grasos del organismo se componen de triglicéridos, una forma neutral, cuyo metabolismo y síntesis ocurre principalmente en el hígado una vez obtenidos de la dieta (Alves-Bezerra y Cohen, 2018) y que se depositan principalmente en el tejido muscular y en forma de reservas grasas como tejido adiposo (Cohen y Fisher, 2013) para poder ser aprovechados en situaciones de elevada demanda energética o ante un aporte energético menor a través de la dieta.

Por otro lado, teniendo en cuenta el papel del colesterol como precursor directo de las hormonas esteroideas claves en la reproducción (Bartels y O'Donoghe, 2011), como son los corticosteroides, andrógenos, estrógenos, progesterona, y también la vitamina D, su análisis resulta relevante dentro de este estudio para valorar la homeostasis global durante una gestación con una dieta reducida, por tratarse de la principal fuente exógena de colesterol. Siendo además un componente mayoritario de la membrana celular, el colesterol cumple un papel crítico en el desarrollo fetal durante la organogénesis, sobre todo teniendo en cuenta que su síntesis por el feto es vestigial en las primeras etapas de la gestación, y se obtiene de la madre a través de la placenta (Baardman *et al.*, 2013), haciendo más significativo aún su estudio para evaluar los efectos del tratamiento en los grupos experimentales.

Simplificando, el principal objetivo de este experimento fue el estudio de estas rutas metabólicas y hormonales sabiendo que durante la gestación el organismo expresa una elevada adaptabilidad debido a que se trata de un estado fisiológico complejo y excepcional, donde se deben cubrir las necesidades tanto de la hembra, como de los fetos en desarrollo y de la producción de leche (Brecchia *et al.*, 2012).

Se ha de señalar, por otro lado, que, de acuerdo con los estándares de Bienestar Animal, la privación de agua o alimento se considera un factor causante de dolor y/o estrés (Webster, 2016), por lo que la evaluación de parámetros hormonales relacionados con el estrés es indispensable cuando se lleva a cabo una RAM. Hay que tener en cuenta, por tanto, que en los lagomorfos y en los roedores, al contrario que en otros mamíferos, el principal glucocorticoide analizado suele ser la corticosterona en lugar del cortisol (Woodman, 1997). La relación entre los niveles plasmáticos de corticosterona, como se ha visto anteriormente, puede relacionarse directamente con signos de estrés comportamental (Manteca *et al.*,2013), por lo que esta hormona podría considerarse como un buen indicador para valorar el nivel de estrés que experimentaron los animales durante el estudio.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Diseño experimental:

El esquema con el diseño de este experimento aparece en la Figura 4.

Se seleccionó una muestra representativa de hembras Neozelandés Blanco x California (n=50) de 18 semanas de edad de la granja que entraban en su primer ciclo productivo, alimentadas *ad libitum* durante su primera gestación y lactación con dieta comercial (2400 kcal ED/kg, 37% FND, 16% PC, 3.7% GB; NANTA, Madrid, España). Durante esta primera lactación, se registró el consumo diario de cada hembra y se estableció en 175g por animal y día.

Tras el parto y el destete a día 30 post parto, todas las hembras de la granja entraron en su segundo ciclo productivo y se realizó la IA con semen fresco diluido siguiendo el mismo protocolo que en el experimento anterior. En este momento (día 0), un total de 374 hembras se distribuyeron de manera aleatoria en 4 grupos experimentales:

- Grupo control (n=92) alimentadas *ad libitum* durante todo el experimento.
- R07 (n=96) sometidas a una RAM desde el día 0 al día 21 post IA.
- R721 (n=92) sometidas a una RAM desde el día 7 al día 21 post IA.
- R021 (n=94) sometidas a una RAM desde el día 0 al día 21 post IA.

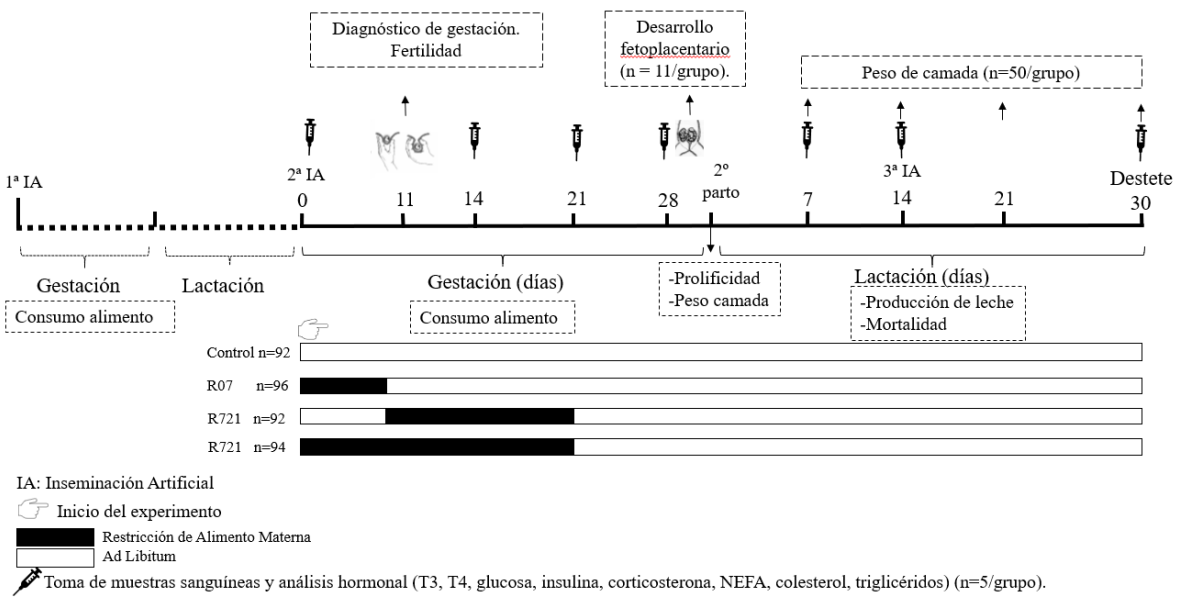


Figura 4: Diseño experimental, experimento 2. Cronograma de RAM, toma de muestras y análisis productivo y hormonal.

La RAM se fijó en el 60% del consumo voluntario estimado durante la primera gestación (105g/día), con el objetivo de mantener las necesidades metabólicas basales de los animales. En la 4ª semana de gestación y hasta el final del estudio, todos los animales pasaron a ser alimentados *ad libitum*. Se realizó el diagnóstico de gestación a día 11 post IA mediante palpación abdominal, y se calculó la fertilidad ([nº de hembras

gestantes a día 11 post IA / nº de hembras inseminadas] x 100). El consumo diario de alimento se registró exclusivamente en las hembras diagnosticadas como gestantes desde el día 0 de gestación hasta el día del parto.

2.2 Estudio fetoplacentario:

El día 28 de gestación, se pesaron y eutanasiaron mediante sobredosis de barbitúricos (Dolethal, Vetoquinol, Madrid, España) 44 hembras gestantes (11 de cada grupo) para realizar una evaluación del desarrollo fetoplacentario. Se llevó a cabo una laparotomía ventral para contar los CL presentes en los ovarios y para calcular la TO por animal. Ambos cuernos uterinos se abrieron para extraer los fetos y sus placentas y así calcular la ratio de estructuras viables ([nº de fetos viables / nº total de fetos] x 100). En los fetos morfológicamente viables, además, se midieron la longitud de los fetos y los diámetros biparietal, occipito-nasal y torácico. Se pesaron los fetos completos y también la cabeza y el cuerpo por separado después de la decapitación. Además, para estudiar patrones de crecimiento fetal, se calcularon los pesos y las ratios (peso del órgano / peso del feto) de los siguientes órganos fetales: cerebro, hígado, corazón, pulmones, tracto digestivo y riñones. También se pesaron tanto las placentas completas como separadas en su parte materna (decidua) y su parte fetal (laberinto), registrando también la longitud, anchura y grosor de cada una de las partes. Por último, se calculó la eficiencia placentaria dividiendo el peso de los fetos entre el peso de las placentas completas.

Imagen 8: Útero de coneja grávido. Fuente: Rodríguez M, Rebollar PG- UPM. 2016.

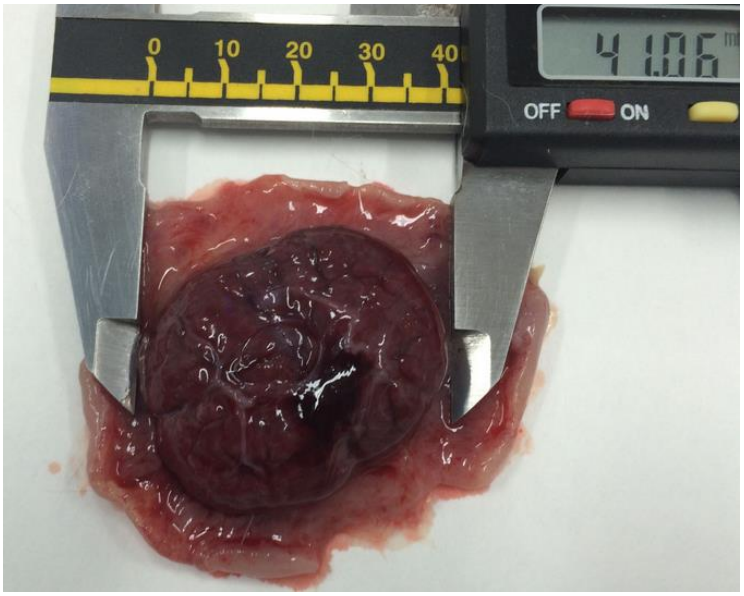


Imagen 9: Placenta a día 28 de gestación, determinación del diámetro de la placenta fetal (laberinto). Fuente: Rodríguez M, Rebollar PG- UPM. 2016.

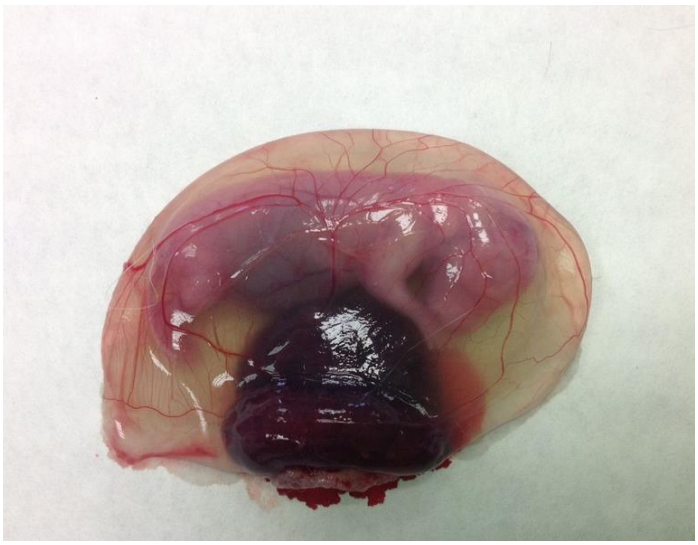
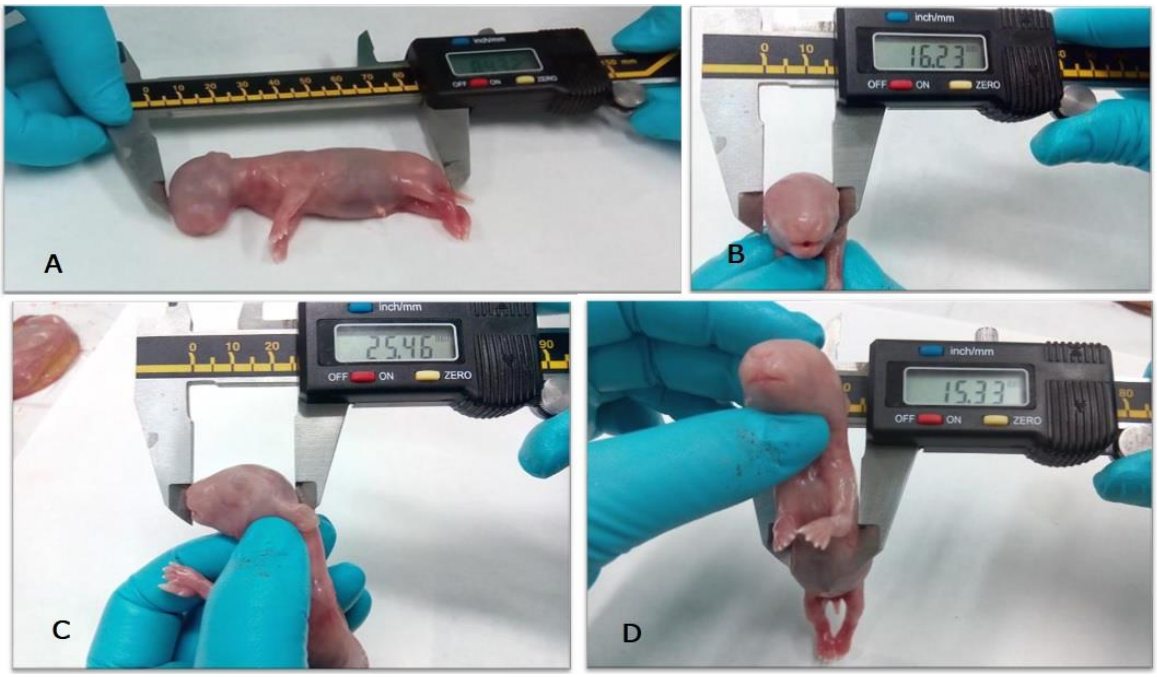
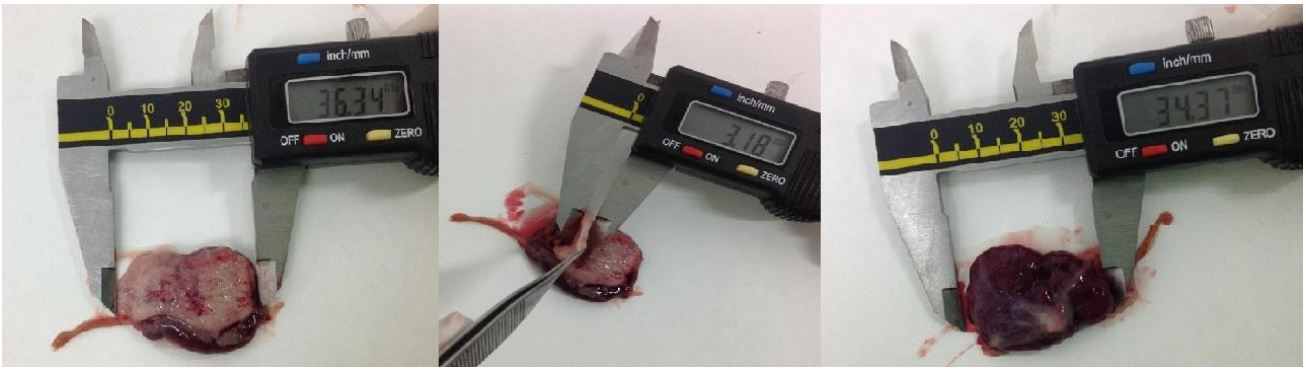


Imagen 10: Feto de conejo y envolturas placentarias (amnios, alantoides y vellosidad coriónica) a día 28 de gestación. Fuente: Rodríguez M, Rebollar PG- UPM. 2016.



Imágenes 11 A-D: Medidas de biometría de fetos a 28 días de gestación. A) Longitud total (LON); B) Diámetro Biparietal (BPD); C) Distancia Occipito-Nasal (ONL); D) Diámetro torácico (TD). Fuente: Rodríguez M, Rebollar PG. UPM. 2017.



Imágenes 12 A-C: Medidas de la placenta a día 28 de gestación. **A)** Longitud de la placenta materna o decidua; **B)** Grosor de la decidua; **C)** Longitud de la placenta materna (laberinto). Fuente: Rebollar PG, Rodríguez M. UPM. 2016.

2.3 Estudio productivo:

La gestación del resto de hembras gestantes se llevó a término para medir los datos de prolificidad (nº de nacidos vivos y muertos por hembra) y registrar los pesos de las camadas al nacimiento. Se estandarizó el tamaño de camada en 8-12 gazapos retirando o añadiendo individuos dentro del mismo grupo experimental. Durante la lactación, un total de 50 camadas de cada grupo experimental se pesaron los días 7, 14 y 21 post parto, y se estimó la producción de leche usando una ecuación de regresión desarrollada por De Blas *et al*. (1995): producción de leche (kg) = 0,75±1,75 LW21, donde Lw21 se corresponde con el peso de la camada a

los 21 días de lactación. El día del destete (30 días post parto), se contabilizaron el número de gazapos destetados por hembra, el peso de la camada y la mortalidad durante la lactación.
Al final del estudio, se calculó el porcentaje de hembras muertas (sacrificadas por abortos o contabilizadas por muertes súbitas) en cada grupo experimental.

2.4 Estudio metabólico y hormonal materno a largo plazo:

Por otro lado, en este experimento se realizó una evaluación de los parámetros metabólicos y hormonales mediante muestras de sangre obtenidas de la arteria central de la oreja de conejas escogidas al azar de todos los grupos experimentales. Se tomó una muestra inicial de sangre en el momento de la IA (día 0 de gestación) de 10 hembras antes de ser asignadas a los grupos experimentales, y después del diagnóstico de gestación, 5 animales gestantes aleatorios de cada grupo se muestrearon en 3 momentos de la gestación: día 14 (n=20), día 21 (n=20), y día 28 (n=20). Después del parto, se recogieron muestras de hembras lactantes (5 animales aleatorios por grupo en cada muestreo) en 3 momentos de la lactación: día 7 (n=20), días 14 (n=20) y día 30 (n=40). El día 14 post parto se volvieron a inseminar todas las hembras siguiendo el protocolo previamente descrito. Después, el día 30 post parto, se llevó a cabo el destete y se tomaron muestras de las hembras gestantes (n=20) y no gestantes (n=20) de la tercera IA. Todas las muestras de sangre se tomaron con EDTA como anticoagulante y se centrifugaron 15 min a 1200 g para obtener plasma.
Además, se realizó un estudio de la homeostasis energética mediante la medición de triyodotironina libre (T_3) y tiroxina (T_4) en sangre usando kits comerciales de inmunoensayo (Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Alemania). La sensibilidad de la prueba fue de 0,05 pg/ml tanto para la T_3 como la T_4 y los coeficientes de variación inter e intra ensayo fueron de 9.8% y 3,6% para la T_3 y de 4.9% y 3.3% para la T_4, respectivamente. Para la evaluación del metabolismo glicémico se determinaron los niveles de insulina y de glucosa en plasma. La insulina se determinó empleando un kit comercial de inmunoensayo (Mercodia Ultrasensitive Insulin ELISA, Mercodia AB, Uppsala, Suecia), cuya sensibilidad fue de 0,071 mU/L y sus coeficientes de variación inter e intra ensayo de 6,2% y 4,2% respectivamente. La glucosa también se determinó con un kit comercial de bioquímica (Glucosa GOD-DAP, Biolabo SAS, Maizy, Francia) con límite de detección de 10 mg/dl y sensibilidad de 100 mg/dl.

La sensibilidad a la insulina se calculó usando una ratio glucosa-a-insulina y un modelo de homeostasis para la resistencia a la insulina (HOMA-IR) empleando la siguiente ecuación: (insulina mU/L x [glucosa (mg/dl) / 18]) / 22,5 (Helfestein *et al.*, 2011). Valores bajos (<1,96) de índice HOMA-IR indican una elevada sensibilidad a la insulina, mientras que valores altos (>3) de índice HOMA-IR indican baja sensibilidad a la insulina o resistencia a la misma.

Los ácidos grasos no esterificados (NEFA) se seleccionaron como uno de los principales indicadores del metabolismo lipídico y se midieron usando un test clínico de bioquímica (Biolabo SAS, Maizy, Francia) con un rango de detección de 0,01-3,0 mmol/L y sensibilidad de 0,050 mmol/L.

El colesterol se seleccionó por su papel metabólico en la síntesis de hormonas esteroideas y tejidos, al tratarse de un componente principal de las membranas celulares (Real y Ascaso, 2020), que regulan a su vez el paso de otras moléculas al citoplasma celular para su aprovechamiento. Se determinó mediante un test bioquímico (Cholesterol CHOD PAP, Biolabo SAS, Maizy, Francia) con un rango de detección entre 4 y 400mg/ml, límite de detección de 0,1mg/dl. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 1,6% y 2,4%, respectivamente.

Los triglicéridos, que representan la principal fuente de energía en cuanto a transporte y almacenamiento de ácidos grasos del organismo a nivel celular y en el plasma sanguíneo (Alves-Bezerra y Cohen, 2018) se determinaron mediante otro kit bioquímico comercial (Triglycerids GPO, Biolabo, Maizy, France), con un rango de detección de 10-1000 mg/ml y un límite de detección de 6mg/ml. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 1,5% y 1,7% respectivamente.

La corticosterona plasmática se empleó como indicador de estrés (Woodman, 1997) y se determinó mediante un kit de inmunoensayo comercial (Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Alemania) con sensibilidad de 1,63 nmol/L y unos coeficientes de variación inter e intra ensayo de 6,5% y 2,8% respectivamente.

2.5 Análisis estadístico:

El software empleado para el análisis estadístico de los resultados fue SAS software (Statistical Analysis System Institute Inc.; Cary, NC, USA, 2001). En todas las pruebas, se consideró como unidad experimental a la coneja. Las diferencias entre grupos en el consumo de alimento se analizaron mediante un ANOVA (Proc GLM) con la restricción de alimento como efecto principal. El efecto de la RAM en el consumo semanal durante la gestación se analizó mediante un análisis de medidas repetidas (MIXED), teniendo como efectos principales el régimen de alimentación (Control, R07, R721, y R021), el tiempo (semana 1, 2, 3 y 4) y la interacción entre ambos. La ratio de ovulación, el peso vivo de las hembras, el número, peso y medidas de los fetos y las placentas, así como la eficiencia placentaria a día 28 de gestación se analizaron (Proc GLM) considerando como efecto principal el régimen de restricción y el tamaño de camada como covariable. Siguiendo el mismo procedimiento, se analizaron la prolificidad y la producción de leche con el régimen de restricción como efecto principal. El efecto de la RAM sobre la fertilidad y la mortalidad de las madres se analizó con un Chi-Cuadrado (Proc CATMOD). Para el análisis del peso de las camadas durante la lactación se empleó un análisis de medidas repetidas (Proc MIXED), considerando la RAM, el tiempo (días 0, 7, 14, 21 y 30 post parto) y la interacción entre ambos en el modelo. En el caso de los parámetros metabólicos y

hormonales, debido a que las muestras se recogieron de animales independientes y seleccionados al azar en cada muestreo, se llevó a cabo un procedimiento GLM, considerando como efectos principales el tratamiento (RAM), el tiempo (gestación: días 14, 21 y 28; lactación: días 7, 14 y 30 post parto), así como la interacción entre ambos. Cuando los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas, las medias de los grupos se compararon empleando un test de Tukey para las variables paramétricas o un test de Kruskal-Wallis para las variables no paramétricas, considerando las diferencias estadísticamente significativas como un valor de $p<0,05$.

Todos los datos se muestran como medias de mínimos cuadrados.

3. RESULTADOS

1.1 Consumo durante la gestación:

Como era de esperar, el consumo total durante la gestación presentó diferencias entre los grupos experimentales ($p<0,0001$). El grupo Control y R07 consumieron 5854±124,3 g y 5529±109 g, respectivamente, seguidos del grupo R721 (4518±112 g) y el grupo R021 (4007±106,3 g). La evolución semanal del consumo diario se muestra en la Figura 5. Curiosamente, la semana después de finalizar la RAM, todos los grupos aumentaron su consumo voluntario sobrepasando el del grupo Control, como el grupo R07 en la segunda semana, y los grupos R721 y R021 en la cuarta semana de gestación.

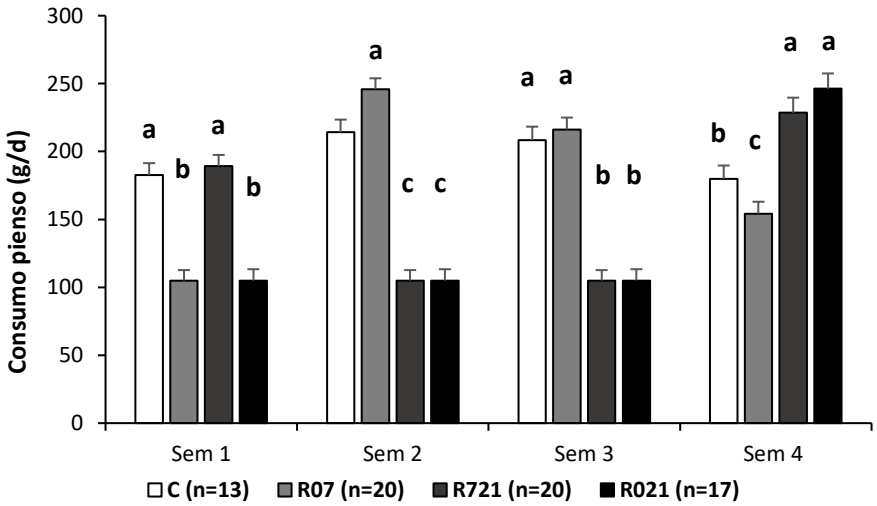


Figura 5: Evolución del consumo diario de pienso (g/día) en conejas gestantes alimentadas *ad libitum* (Control), restringidas al 60% de su ración durante 1 semana desde el día 0 al 7 de gestación (R07), 2 semanas desde el día 7 al 21 (R721) y 3 semanas desde el día 0 al 21 de gestación (R021). Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales ($p<0,0001$).

1.2 Estudio fetoplacentario:

Los resultados obtenidos a día 28 de gestación se muestran en la Tabla 2, que contiene hallazgos interesantes en varios aspectos. En primer lugar, respecto a las reservas corporales hacia el final de gestación, las hembras restringidas durante dos semanas (R721) tuvieron un menor peso vivo (PV) que las de los grupos Control y R07 (p=0,0254), mientras que las restringidas durante 3 semanas (R021) presentaron un PV intermedio.

Desde el punto de vista reproductivo, el número de CL, el número total de fetos por hembra, la tasa de implantación y la viabilidad fetal no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos, aunque en R07 se pudo apreciar una tendencia (p=0,0824) a presentar mayor número de fetos con menor viabilidad.

Tabla 2. Número y parámetros biométricos de fetos de 28 días de gestación en conejas alimentadas *ad libitum* (Control), restringidas al 60% de su ración durante 1 semana desde el día 0 al 7 de gestación (R07), 2 semanas desde el día 7 al 21 (R721) y 3 semanas desde el día 0 al 21 de gestación (R021).

	Control n=11	R07 n=11	R721 n=11	R021 n=11	SEM	p valor
PV madres (g)	4638^{a}	4640^{a}	4342^{b}	4413^{ab}	80.90	0.0254
Cuerpos lúteos	12.2	12.3	13.1	13.4	0.58	0.4350
Fetos totales / madre	11.7	13.2	12.5	12.5	0.38	0.0814
Tasa Implantación[1] (%)	92.5	97	95.2	91	2.57	0.3684
Viabilidad Fetal[2] (%)	94.6	84.9	90.3	90.1	9.13	0.0824
Peso fetos (g)						
Total	39.7^{a}	38.4^{ab}	37.4^{b}	37.0^{b}	1.78	0.0028
Cabeza	9.32^{a}	9.06^{ab}	8.75^{b}	8.71^{b}	0.35	0.0001
Tronco	29.0^{a}	28.0^{ab}	27.0^{b}	26.8^{b}	1.43	0.0014
Medidas fetos (mm)						
CRL	101.4^{a}	99.5^{ab}	98.7^{b}	98.6^{b}	1.83	0.0018
OND	29.0^{a}	29.2^{a}	28.7^{ab}	28.3^{b}	0.61	0.0032
BPD	19.3	19.2	19.3	19.0	0.52	0.5801
TD	20.6^{b}	21.3^{a}	20.8^{b}	20.2^{b}	0.71	0.0034
Peso órganos (g)						
Cerebro	0.913	0.901	0.892	0.901	0.04	0.6395
Hígado	2.64^{a}	2.39^{b}	2.36^{b}	2.39^{b}	0.18	0.0097
Corazón	0.221	0.207	0.219	0.209	0.02	0.0734
Pulmones	0.134^{a}	0.126^{a}	0.122^{b}	0.126^{a}	0.08	0.0166
Riñones	0.359^{a}	0.337^{ab}	0.323^{b}	0.307^{b}	0.02	0.0001
Tracto digestivo	0.208	0.215	0.207	0.197	0.17	0.0952
Ratios						
Cerebro	0.024	0.024	0.024	0.025	0.00	0.4033
Hígado	0.066^{a}	0.061^{b}	0.064^{ab}	0.066^{a}	0.00	0.0033
Corazón	0.006^{a}	0.005^{b}	0.006^{a}	0.006^{a}	0.00	0.0028
Pulmones	0.034	0.033	0.033	0.034	0.00	0.0942
Riñones	0.009^{a}	0.009^{a}	0.009^{a}	0.008^{b}	0.00	0.0001
Tracto digestivo	0.053	0.056	0.056	0.053	0.00	0.1759
Cerebro : Hígado	0.367	0.395	0.400	0.395	0.03	0.2273

PV: peso vivo. [1](nº de fetos / nº de cuerpos lúteos) x 100; [2](nº de fetos viables / nº total de fetos) x 100; CRL: longitud dorsal; TD: diámetro torácico; BPD: diámetro biparietal; OND: diámetro occipito-nasal; Los datos se presentan como medias de mínimos cuadrados. Ratio: peso del órgano / pero del feto. Los valores en la misma fila con diferentes letras, indican diferencias estadísticamente significativas. SEM: media del error estándar.

La RAM sí que afectó significativamente (p>0,01) a los pesos totales, peso de la cabeza, del tronco de los fetos y a su longitud, siendo menores en los grupos R721 y R021 que en el grupo Control, e intermedios en R07. Los diámetros cefálicos y biparietales no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (p>0,05), pero los diámetros occipitonasales fueron mayores en los grupos Control y R07 que en R021, e intermedios en R721 (p=0,0032). Los diámetros torácicos de los fetos fueron mayores en R07 en comparación con los otros tres grupos (p=0,0034), y en cuanto a los órganos fetales, solamente el hígado, los pulmones y los riñones mostraron diferencias en el peso entre los grupos (p=0,0097; p=0,0166, p=0,0001, respectivamente), siendo los del grupo Control en general de mayor peso, a excepción del hígado.

Los pesos y dimensiones del laberinto y la decidua de las hembras eutanasiadas el día 28 de gestación se muestran en la Tabla 3. Sobre estos datos es reseñable que la placenta completa del grupo R07 tuvo un peso mayor que la de los grupos R721 y R021, y que en este caso fue el grupo Control el que presentó valores intermedios (p<0,0001). Por otro lado, el laberinto del grupo R07 tuvo una tendencia a ser el de mayor peso (p=0,0809), mientras que en el grupo R021 el laberinto fue el más estrecho (P<0.0053). En las hembras sometidas a RAM durante dos semanas (R721), el peso de la decidua fue menor (p<0,0001) que en los otros grupos. La decidua con mayor longitud la presentó el grupo Control (p<0,0001) y la más delgada R721 (p=0,0069). Por último, la eficiencia placentaria más baja se observó en el grupo R07, la más elevada en R721, y los grupos Control y R021 presentaron valores intermedios (p=0,0162).

Tabla 3. Peso y dimensiones de las placentas de hembras gestantes a día 28 de gestación, alimentadas *ad libitum* (Control), restringidas al 60% de su ración durante 1 semana desde el día 0 al 7 de gestación (R07), 2 semanas desde el día 7 al 21 (R721) y 3 semanas desde el día 0 al 21 de gestación (R021).

	Control n=11	**R07 n=11**	**R721 n=11**	**R021 n=11**	**SEM**	**p value**
Placenta entera (g)	5.16^{ab}	5.21^{a}	4.60^{c}	4.81^{bc}	0.30	0.0001
Laberinto						
Peso (g)	3.27	3.51	3.30	3.33	0.80	0.0809
Longitud (mm)	37.40^{a}	35.80^{a}	35.50^{a}	33.90^{b}	4.28	0.0001
Anchura (mm)	28.50	28.40	27.70	27.40	3.72	0.1286
Grosor (mm)	5.16^{a}	5.17^{a}	4.70^{b}	5.05^{ab}	0.99	0.0053
Decidua						
Peso (g)	1.48^{a}	1.55^{a}	1.22^{b}	1.40^{a}	0.11	0.0001
Longitud (mm)	39.61^{a}	37.32^{b}	37.30^{b}	36.09^{b}	1.41	0.0001
Anchura (mm)	17.84^{a}	18.76^{a}	16.42^{b}	18.39^{a}	0.95	0.0001
Grosor (mm)	3.45^{a}	3.52^{a}	3.11^{b}	3.27^{ab}	0.26	0.0069
Eficiencia placentaria[1]	7.52^{ab}	7.34^{b}	7.86^{a}	7.45^{ab}	0.34	0.0162

[1] *Peso del feto / peso placenta completa. Los datos se muestras como media de mínimos cuadrados. Valores en la misma línea con letras diferentes reflejan diferencias estadísticamente significativas. SEM: media del error estándar.*

1.3 Rendimiento productivo:

Los resultados relacionados con el rendimiento productivo se muestran en la Tabla 4.

La fertilidad, los nacidos vivos y nacidos muertos, así como el peso de la camada al nacimiento y durante la lactación no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (p>0,05). Sin embargo, después del ajuste de camadas, el efecto de la RAM sobre el número de gazapos destetados y la mortalidad durante la lactación mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos (p=0,0004 y p=0,0325, respectivamente). Las hembras de los grupos Control y R07 presentaron un mayor número de gazapos destetados que las del grupo R07, y el grupo R021 un número intermedio. La mayor y menor mortalidad durante la lactación se dio en las camadas de R021 y R07, respectivamente.

Al finalizar el estudio, el porcentaje de hembras eutanasiadas fue de 7,6% en el grupo Control, 4,2% en R07, 5,4% en R721 y 6,4% en R021 (p=0,05).

Tabla 4. Parámetros productivos de conejas alimentadas *ad libitum* (Control), restringidas al 60% de su ración durante 1 semana desde el día 0 al 7 de gestación (R07), 2 semanas desde el día 7 al 21 (R721) y 3 semanas desde el día 0 al 21 de gestación (R021) en su segundo ciclo.

	Control n=92	R07 n=96	R721 n=92	R021 n=94	RMSE	p valor
Fertilidad[1] (%)	71.11	76.04	78.26	78.72		0.6129
Partos	59	69	67	68		
T. camada						
N. vivos	11.01	10.98	10.05	11.02	3.17	0.2904
N. muertos	0.50	0.43	0.32	0.24	1.00	0.5514
Destetados (30 dpp)	10.20[a]	10.54[a]	9.59[b]	10.04[ab]	1.14	0.0004
P. camada (g)[2]						
Al parto	605.70	619.34	580.93	643.98	142.6	0.1276
7dpp	1306	1361	1272	1288	216.2	0.1646
14dpp	2290	2398	2260	2276	318.1	0.1040
21 dpp	3314	3394	3227	3304	381.2	0.1613
30 dpp (destete)	5782	5708	5447	5484	1129	0.3592
Producción de leche (kg)[3]	8.29	8.49	8.07	8.26	9.53	0.1613
Mortalidad en lactación (%)[4]	5.13[ab]	2.83[b]	3.43[ab]	6.32[a]	6.77	0.0325

[1] Nº de hembras gestantes después del diagnóstico de gestación el día 11 post IA / nº total de hembras inseminadas x 100. [2]Este parámetro se obtuvo a partir de 50 camadas de cada grupo experimental. [3]Producción de leche = 0.75±1.75xLW21 (kg) donde LW21 se corresponde con el peso de la camada en el día 21 de lactación. [4]Mortalidad: [100-(gazapos destetados / nº de gazapos tras ajuste de camada a 8-12 gazapos) x 100]. Los datos se muestran como medias de mínimos cuadrados. RMSE: raíz cuadrada de la media del error. Valores en la misma línea con letras diferentes reflejan diferencias estadísticamente significativas. dpp: días post-parto.

1.4 Estudio metabólico y hormonal a largo plazo:

Los datos obtenidos durante la gestación en cuanto a los parámetros endocrinos y metabólicos de los cuatro grupos experimentales se recogen en la Tabla 5.

En lo referente a las hormonas tiroideas, los animales sometidos a la RAM de mayor duración (R021), mostraron concentraciones plasmáticas de T_3 menores a las de los grupos Control y R07 ($p=0,0196$), pero similares a las del grupo R721. En los días 14 y 21 de gestación, las concentraciones plasmáticas de T_3 disminuyeron significativamente en comparación con las obtenidas a día 0 de gestación, y recuperaron valores intermedios sobre el día 28 ($p=0,026$); ocurrió lo mismo con las concentraciones plasmáticas de T_4 los días 14 y 21, que también fueron menores que a día 28 ($p=0,0001$), pero más similares a las del día 0.
La RAM no tuvo efectos significativos sobre las concentraciones de T_4, la ratio T_3-T_4, la glucosa plasmática ni el índice HOMA-IR ($p>0,05$).

Sin embargo, en el grupo R721 la insulinemia fue menor y la ratio glucosa-insulina mayor que en los grupos Control y R07, pero similares a los de R021 ($p=0,0225$ y $p=0,0482$, respectivamente), y en todos los grupos se observó un marcado aumento de la glucosa hacia el final de la gestación ($p<0,0001$).
Los mayores valores de NEFA se encontraron en las hembras del grupo R721, y los más bajos en las de R07, con los grupos Control y R021 en valores intermedios ($p=0,0158$), y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre grupos en los valores de NEFA a lo largo de la lactación ($p<0,05$).
Por último, las concentraciones plasmáticas de corticosterona solamente se vieron afectadas por el efecto del tiempo, siendo las concentraciones más bajas las registradas los días 21 y 28 de gestación ($p<0,0001$).

La interacción de los efectos RAM y tiempo mostró efectos significativos a nivel de las concentraciones plasmáticas de T_3 ($p=0,0353$), insulina ($p=0,0055$), NEFA ($p=0,0100$) y el índice HOMA-IR ($p=0,0049$), cuyas representaciones se encuentras en las Figuras 6A-D. El día 21 de gestación las hembras del grupo R021 registraron un marcado descenso de las concentraciones plasmáticas de T_3 en comparación con el grupo R07, pero similares a las del grupo Control y el grupo R721, mostrando también en el día 21 una concentración plasmática de insulina más baja los grupos R721 y R021 (las restringidas durante más tiempo). Los grupos Control y R07 tuvieron las menores concentraciones de NEFA en el día 14 de gestación.
Durante la primera mitad de la gestación, el índice HOMA-IR se mantuvo en valores inferiores a 3, superando este valor a partir del día 21 en los grupos Control y R07 y provocando un posible estado inicial de resistencia a la insulina. En el día 28 de gestación, el valor de HOMA-IR era superior a 3 en todos los grupos excepto en R721.

Los niveles de TG fluctuaron a lo largo de la gestación en los diferentes grupos, pero sin llegar a mostrar diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Hacía el final de la gestación, todos los grupos presentaron concentraciones plasmáticas de TG más bajas que en las semanas previas, incluso por debajo de la medición basal a día 0. El CHO tampoco presentó diferencias estadísticamente significativas entre los

grupos experimentales durante la gestación, pero en la segunda semana de gestación los valores del grupo R021 fueron mayores que en los demás grupos, mostrando una tendencia a diferenciarse del grupo control (p=0,0591). En la última semana de gestación todos los grupos presentaban concentraciones similares.

Tabla 5. Efecto de una Restricción de Alimento Materna (RAM) y del tiempo sobre los parámetros endocrinos y metabólicos en conejas alimentadas *ad libitum* (Control), restringidas al 60% de su ración durante 1 semana desde el día 0 al 7 de gestación (R07), 2 semanas desde el día 7 al 21 (R721) y 3 semanas desde el día 0 al 21 de gestación (R021).

	Restricción de Alimento Materna				Días de gestación					p valor		
Gestación	**Control n=5**	**R07 n=5**	**R721 n=5**	**R021 n=5**	**0 n=10**	**14 n=20**	**21 n=20**	**28 n=20**	**RMSE**	P_{RAM}	p_{Time}	$P_{RAM\ xTime}$
T3 (pg/ml)	3.76^{a}	3.77^{a}	3.19^{ab}	3.06^{b}	4.16^{a}	3.07^{b}	3.02^{b}	3.54^{ab}	0.79	0.0196	0.0026	0.0353
T4 (pg/ml)	4.74	4.24	5.00	5.16	5.89^{ab}	3.66^{b}	2.58^{b}	7.00^{a}	3.11	0.8525	0.0001	0.5731
T3 to T4 ratio	1.45	1.05	1.01	1.12	0.91^{ab}	1.00^{a}	2.06^{a}	0.66^{b}	1.24	0.8079	0.0022	0.5237
Insulin (mU/l)	15.73^{a}	15.71^{a}	9.47^{b}	12.45^{ab}	16.26	10.10	12.80	14.20	6.57	0.0225	0.0871	0.0055
Glucosa (mg/dl)	79.94	78.00	74.49	84.13	63.82^{b}	61.72^{b}	76.64^{b}	114.38^{a}	22.34	0.6207	0.0001	0.7501
Ratio Gluc/Ins	6.79^{b}	7.12^{b}	12.93^{a}	9.17^{ab}	4.59	9.56	10.26	11.70	6.79	0.0482	0.0802	0.2518
HOMA-IR	2.90	3.11	1.75	2.87	2.63^{ab}	1.44^{b}	2.40^{b}	4.15^{a}	1.79	0.1140	0.0001	0.0049
Triglicéridos (mg/dl)	81.14	101.28	103.08	123.11	49.08^{b}	166.24^{a}	171.46^{a}	21.84^{b}	65.17	0.3975	0.0001	0.1588
Colesterol (mg/dl)	32.88	51.57	40.80	43.45	53.95^{a}	47.29^{a}	28.36^{b}	39.09^{ab}	18.98	0.0802	0.0039	0.0725
NEFAS (mmol/l)	0.42^{ab}	0.33^{b}	0.62^{a}	0.52^{ab}	0.54	0.54	0.46	0.35	0.27	0.0158	0.0781	0.0100
Corticosterona (ng/ml)	257.45	274.56	256.02	251.15	293.30^{a}	363.82^{b}	192.20^{c}	195.85^{c}	12.13	0.7344	0.0001	0.2519

NEFAS: Ácidos grasos no esterificados. RMSE: raíz cuadrada de la media del error. HOMA-IR: Modelo de Evaluación de la Homeostasis para la resistencia a la insulina [Insulina x (Glucosa/18)/22.5]. Valores en la misma línea con letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas.

Como se muestra en la Tabla 6, la RAM no tuvo efecto sobre ningún parámetro endocrino o metabólico de las madres durante la lactación (p>0,05). A lo largo de este periodo, los valores de T3 y glucosa se mantuvieron en rangos similares a los de las dos primeras semanas de lactación, pero los valores de la insulina y el HOMA-IR cayeron el día 14 de lactación (p=0,0006) en comparación con los valores obtenidos a día 7. El día del destete, las hembras no gestantes de la tercera IA mostraron concentraciones menores de T3 que las que sí quedaron gestantes (p>0,0056), pero el índice HOMA-IR, la glucosa y la insulina mantuvieron concentraciones similares tanto en ambos casos (p>0,05).

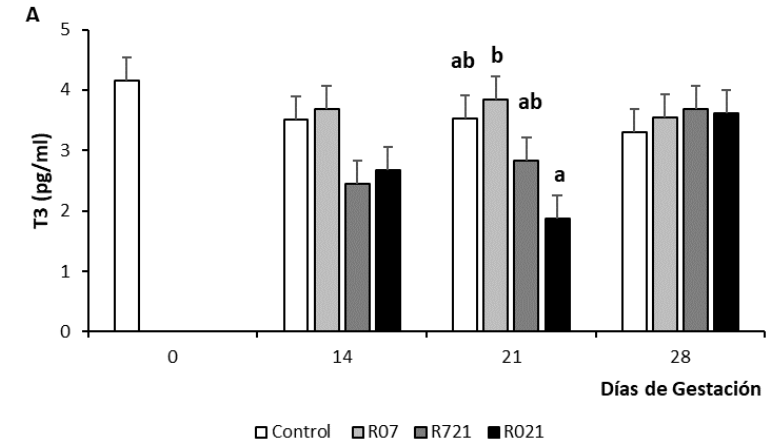
El consumo de energía, entendido como los niveles de NEFA circulantes en sangre, fue similar en todos los grupos a lo largo de la lactación.

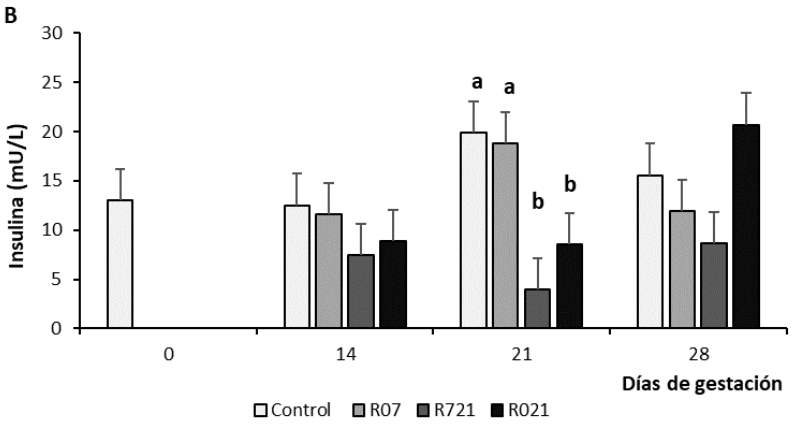
Los niveles plasmáticos de los TG fueron similares en todos los grupos durante las dos primeras semanas, observándose diferencias solamente hacia el final de este periodo entre las hembras gestantes y no gestantes tras la tercera IA. En el caso de las hembras gestantes, los niveles de TG circulantes fueron más elevados que en las hembras no gestantes (Figura 6G).

Los valores de CHO oscilaron a lo largo de las semanas de lactación, pero se mantuvo similar entre los diferentes grupos experimentales (Figura 6H). Las hembras que quedaron gestantes en la tercera IA presentaron concentraciones plasmáticas ligeramente inferiores a las hembras no gestantes en el mismo tiempo de muestreo.

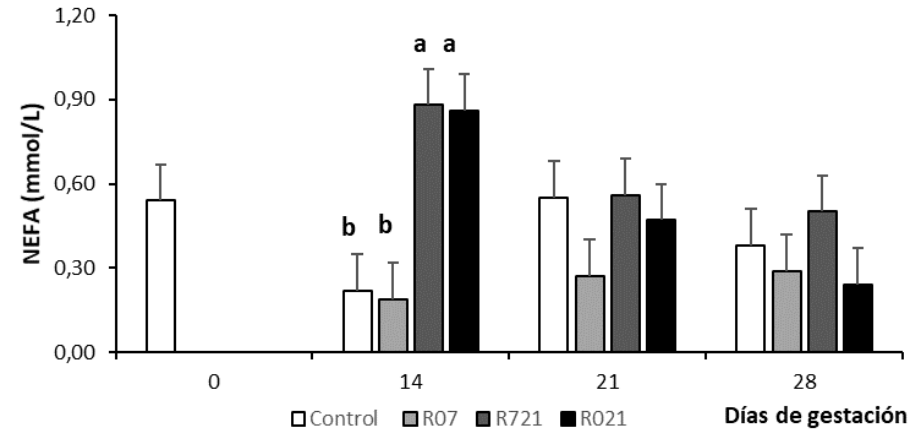
Las concentraciones de CTC, empleadas como un posible indicador de estrés de los animales, en general no se vieron afectadas por la RAM, pero sí que se apreciaron aumentos significativos de su concentración durante el transcurso de la lactación. Hacia el final la gestación se apreció un descenso de los niveles plasmáticos detectados, siendo ligeramente más acusado en los grupos R721 y R021. En el periodo de lactación, sin embargo, fueron estos dos grupos los que mostraron mayores concentraciones plasmáticas de CTC respecto al grupo Control, tanto las hembras que habían quedado gestantes en la tercera IA como las que no experimentaron una gestación y lactación simultáneas.

La interacción entre el tratamiento (RAM) y el tiempo no afectó a ninguno de los valores estudiados.

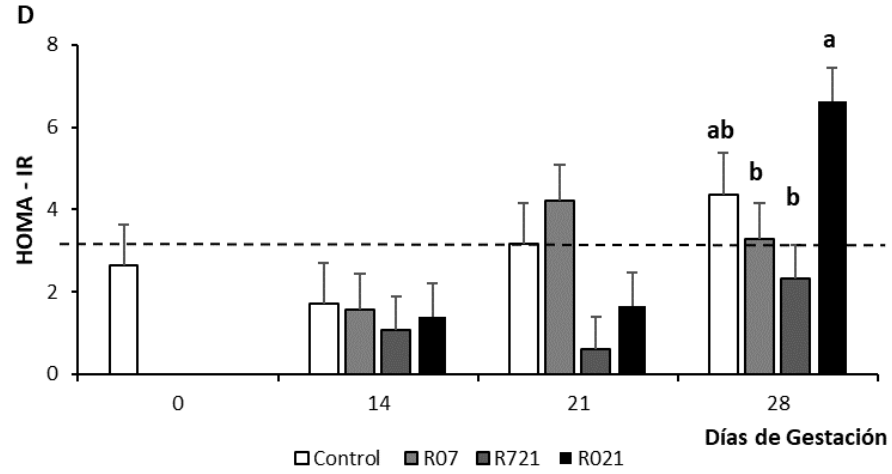




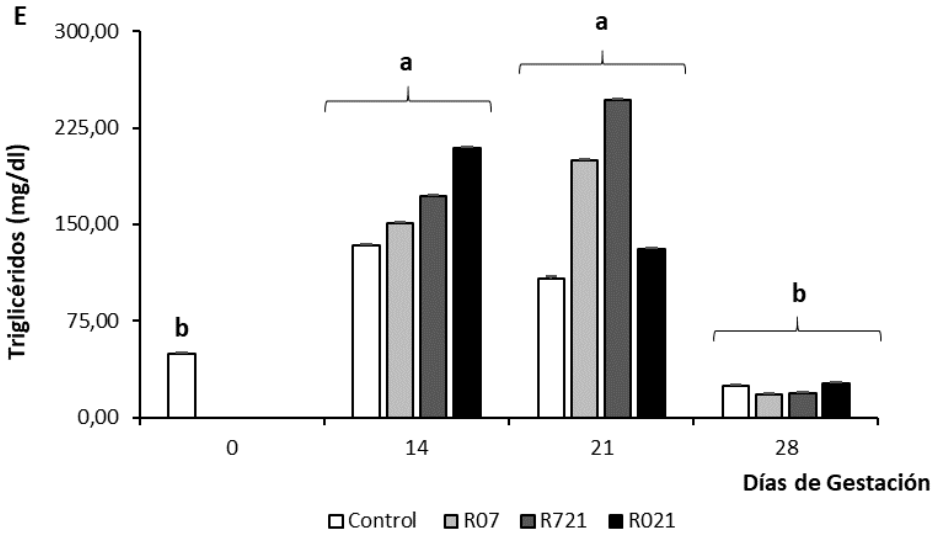
C

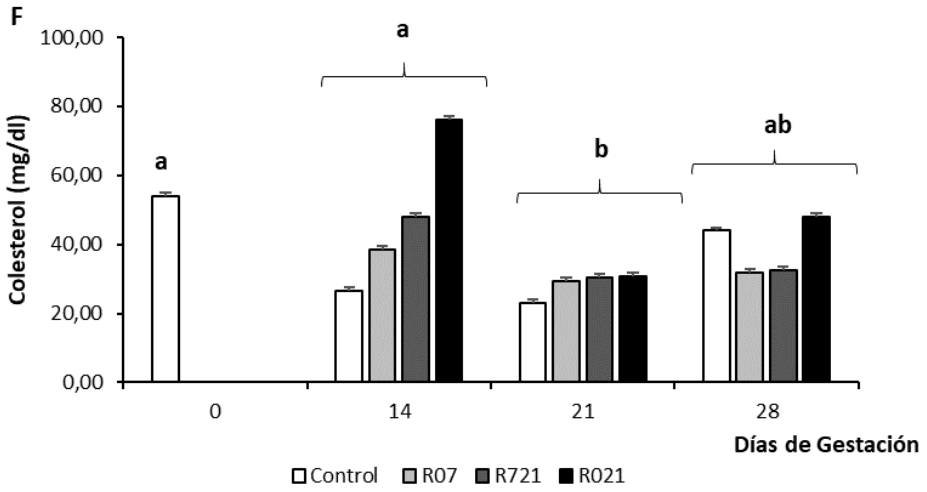

1,20
0,90
0,60
0,30
0,00
NEFA (mmol/L)
a a
b b
0
14
21
28
Control R07 R721 R021
Días de gestación

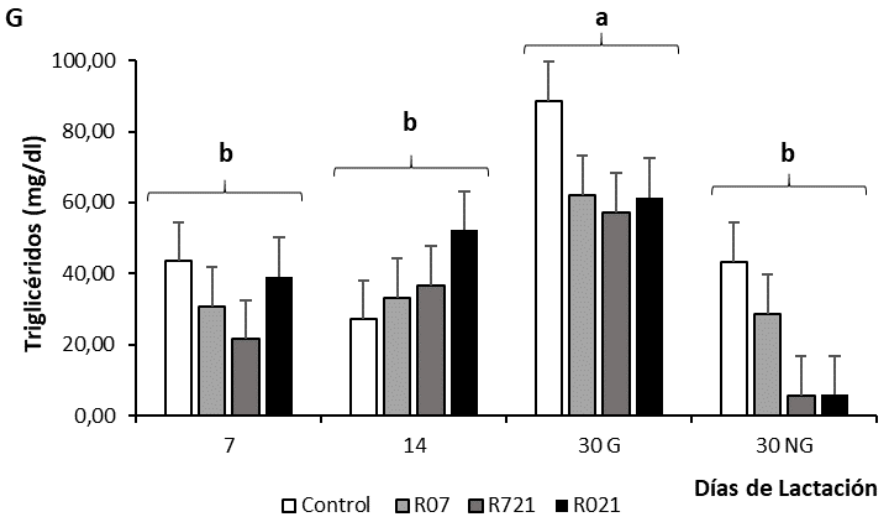
D

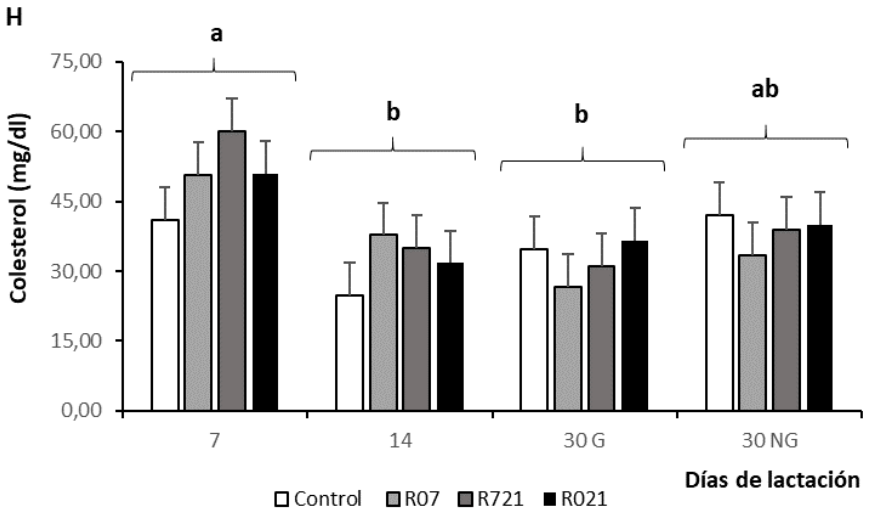

8
6
4
2
0
HOMA - IR
a
ab
b
b
0
14
21
28
Control R07 R721 R021
Días de Gestación

E


300,00
225,00
150,00
75,00
0,00
Triglicéridos (mg/dl)
a
a
b
b
0
14
21
28
Control R07 R721 R021
Días de Gestación


F
100,00
80,00
60,00
40,00
20,00
0,00
Colesterol (mg/dl)
a
a
b
ab
0
14
21
28
Días de Gestación
Control
R07
R721
R021


G
100,00
80,00
60,00
40,00
20,00
0,00
Triglicéridos (mg/dl)
b
b
a
b
7
14
30 G
30 NG
Días de Lactación
Control
R07
R721
R021


H
75,00
60,00
45,00
30,00
15,00
0,00
Colesterol (mg/dl)
a
b
b
ab
7
14
30 G
30 NG
Días de lactación
Control
R07
R721
R021

Figuras 6A-H: Efecto de la Restricción de Alimento Materna y el tiempo en **A)** las concentraciones plasmáticas de triiodotironina (T3); **B)** insulina; **C)** NEFA; **D)** HOMA-IR; **E)** triglicéridos; **F)** colesterol en conejas gestantes alimentadas *ad libitum* (Control), restringidas al 60% de su ración durante 1 semana desde el día 0 al 7 de gestación (R07), 2 semanas desde el día 7 al 21 (R721) y 3 semanas desde el día 0 al 21 de gestación (R021). Las figuras 6**G** y 6**H** representan los valores de concentraciones plasmáticas de triglicéridos y colesterol durante la fase de lactación, respectivamente. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales ($p<0,05$). Cada barra de los días 14, 21 y 28 de gestación muestra la media de 5 animales, y en el día 0 la de 10 animales. La línea discontinua de la figura 6D representa el valor por encima del cual el HOMA-IR indica la presencia de resistencia a la insulina.

Tabla 6. Efecto de la Restricción de Alimento Materna (RAM) y el tiempo sobre los parámetros endocrinos y metabólicos en lactación de conejas alimentadas *ad libitum* (Control), restringidas al 60% de su ración durante 1 semana desde el día 0 al 7 de gestación (R07), 2 semanas desde el día 7 al 21 (R721) y 3 semanas desde el día 0 al 21 de gestación (R021).

Lactación	Restricción de Alimento Materna				Días de lactación				RMSE	pvalor		
	Control n=5	R07 n=5	R721 n=5	R021 n=5	7 n=20	14[1] n=20	30[2] (P) n=20	30[2] (NP) n=20		p_{RAM}	p_{Time}	$p_{RAM\ xTime}$
T3 (pg/ml)	3.47	3.41	3.48	3.40	3.70[a]	3.56[a]	3.54[a]	2.95[b]	0.66	0.9830	0.0056	0.0878
T4 (pg/ml)	10.10	12.83	11.26	11.38	7.84	12.45	13.18	12.10	5.76	0.6012	0.0753	0.5611
Ratio T3 - T4	0.57	0.36	0.40	0.72	0.74	0.67	0.33	0.31	0.58	0.2853	0.0847	0.2714
Insulina (mU/L)	16.36	12.09	13.36	14.23	21.48[a]	12.83[b]	10.05[b]	11.68[b]	7.41	0.4223	0.0006	0.2539
Glucosa (mg/dl)	114.33	109.93	109.31	109.51	116.51[a]	111.28[ab]	112.09[ab]	103.20[b]	12.40	0.6352	0.0199	0.2822
Ratio Gluc/Ins	10.31	21.19	11.05	17.95	6.73[b]	15.13[b]	23.34[a]	15.30[b]	15.83	0.1555	0.0469	0.0802
HOMA IR	4.73	3.32	3.70	3.95	6.26[a]	3.58[b]	2.82[b]	3.05[b]	2.17	0.3178	0.0003	0.2801
Triglicéridos (mg/dl)	50.59	38.64	30.20	39.63	33.65[b]	37.22[b]	67.29[a]	20.90[b]	24.80	0.1780	0.0001	0.4702
Colesterol (mg/d)	35.70	36.34	41.27	39.82	50.71[a]	31.59[b]	32.23[b]	38.59[ab]	13.97	0.6346	0.0001	0.8058
NEFAS (mmol/l)	0.26	0.28	0.25	0.29	0.24	0.26	0.27	0.30	0.12	0.8113	0.4605	0.2305
Corticosterona (ng/ml)	239.11	234.36	215.89	246.54	151.11[a]	217.52[b]	272.84[c]	294.44[c]	11.51	0.4158	0.0001	0.2334

HOMA-IR: Modelo de Evaluación de la Homeostasis para la resistencia a la insulina. NEFA: Ácidos grasos no esterificados. [1]Tercera IA el día 14 de lactación.. [2]Destete. –G-: Gestantes. –NG-: No gestantes. RMSE: raíz cuadrada de la media del error. Valores en la misma línea con letras diferentes, representan diferencias estadísticamente significativas.

4. DISCUSIÓN

Este estudio aborda las potenciales consecuencias de una RAM moderada en distintos periodos (1, 2, o 3 semanas) a lo largo de toda la gestación sobre el rendimiento productivo, incluyendo el desarrollo fetoplacentario y el crecimiento post natal y supervivencia de las camadas de hembras primíparas, e introduce aspectos más detallados sobre parámetros endocrinos y hormonales durante la gestación y la subsiguiente lactación.

Tras diferentes periodos de RAM, las hembras realimentadas *ad libitum* aumentaron significativamente su consumo voluntario de alimento, resultados que concuerdan con los obtenidos en trabajos previos del grupo (López-Tello *et al.*, 2017; García-García *et al.*, 2021a; García-García *et al.*, 2021b). Las hembras de los grupos R721 y R021 consumieron a lo largo de la gestación un total de 1,3kg y 1,8kg menos de alimento que las del

grupo Control, respectivamente. Las hembras del grupo R07 redujeron su consumo 300g por debajo del consumo del grupo Control. Si consideramos el consumo de las hembras del grupo Control en las semanas 2 y 3 de gestación como el consumo medio normal (227±6,0 g/d y 228,3±6,1 g/d), los grupos R721 y R021 consumieron un 46% del total de alimento que consumieron las hembras del grupo Control. Debido a ello, el PV de estos animales fue un 5,2% menor en comparación al de los grupos Control y R07.

Como era de esperar, el número de CL encontrados en las hembras a día 28 de gestación no presentó diferencias estadísiticamente significativas entre grupos experimentales, dado que la RAM se llevó a cabo después de realizar la IA, por lo que no hubo ningún efecto sobre la tasa de ovulación. Estos resultados son iguales a los obtenidos en estudios donde solamente se comparaban los grupos R021 y Control (García-García *et al.*, 2021a; 2021b). Pese a ello, las hembras del grupo R07 tendieron a tener un mayor número de fetos, aunque con menor viabilidad. En los conejos, la implantación y placentación ocurren pasados los días 6-7 de gestación (Enders y Schlafke, 1971), por lo que, en este estudio, las hembras del grupo R07 en ese momento aumentaron su consumo voluntario por encima del consumo del grupo Control, debido a la finalización de la RAM, hecho que podría explicar el aparente aumento de fetos implantados en las hembras de este grupo. Al mismo tiempo, la menor viabilidad fetal podría deberse a una mayor competición por los recursos entre los fetos implantados, como reflejan algunos autores en sus trabajos (Argente *et al.*, 2008).

Las dimensiones de los fetos se vieron afectadas por la RAM de tal modo que cuanto mayor fue la duración de ésta, menor fue el peso y la longitud de los fetos, aunque el diámetro torácico y el diámetro occipito-nasal no tuvieron la misma respuesta. La RAM normalmente provoca que los órganos vitales, como el cerebro o el hígado, aumenten su peso relativo en detrimento de otros órganos (López-Tello *et al.*, 2017; Godfrey *et al.*, 2001). Curiosamente, esta tendencia no se observó en este estudio, y órganos como los riñones o el hígado redujeron su peso en los fetos de las madres más restringidas. Varios estudios (García-García *et al.*, 2021a; Rommers *et al.*, 2004b; Buczkowska y Jarosz-Chobot, 2001) establecen que cuanto mayor y más largo es el periodo de restricción, mayor es la probabilidad de encontrar alteraciones en el crecimiento y desarrollo fetal. Cappon *et al.* (2005) llevaron a cabo un experimento evaluando valores de RAM desde ligeros a severos (desde 110g/d hasta 15g/d) desde los días 7 a 19 de gestación (periodo que comprende desde la implantación hasta el cierre del paladar duro), y registraron su efecto en el desarrollo fetal. Estos autores observaron que, en los casos de RAM severa, el tamaño y peso de los fetos se reducía, y la incidencia de abortos y defectos en la osificación aumentaba. Dichos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios (Rommers *et al.*, 2004b; Clark *et al.*, 1986) que evaluaron la incidencia de abortos y anomalías del crecimiento o desarrollo fetal debidas a la RAM, donde estos autores concuerdan que los principales factores a considerar son el grado de restricción, la duración y lo más importante: el periodo de la gestación en el que tiene lugar (Brecchia *et al.*,

2012), destacando la segunda mitad de la gestación como el periodo más crítico en lo relacionado a la ingesta de alimento y el consumo de energía.

Los hallazgos relacionados con el desarrollo fetal y la comparación de tamaño entre órganos de los grupos experimentales a día 28 de gestación, sugieren que el ajuste de la ración y los periodos de restricción aplicados en este estudio no tuvieron efectos a largo plazo en los fetos, ni en el posterior rendimiento de la camada. De hecho, en estas condiciones experimentales, la ratio cerebro/hígado fue la misma en todos los grupos experimentales, y no se observaron variaciones críticas en el peso relativo de los demás órganos fetales; esto apoya la idea de que la RAM aplicada en este estudio es en efecto moderada en comparación con los registros existentes en la literatura y que, por lo tanto, no induce alteraciones en el crecimiento fetal ni en la organogénesis.

Además, la RAM de 1, 2 o 3 semanas tuvo efectos sobre las estructuras placentarias. Las placentas más grandes fueron las del grupo R07, pero también fueron las de menor eficiencia, lo cual significaría que a pesar de que el crecimiento fetal está directamente relacionado con la placenta (Robinson *et al.*, 1994), en este grupo experimental las placentas fueron más grandes que los fetos. No obstante, el grupo R721 presentó las placentas de menor tamaño de todo el estudio, ya que en el periodo de formación de este tejido las conejas se encontraban restringidas y su restricción duró más tiempo. Estos resultados sugieren que, aunque la eficiencia placentaria fue baja en R07 y alta en R721, la cantidad de energía aportada durante el periodo de realimentación *ad libitum* fue suficiente para un mantenimiento adecuado de la gestación, ya que las hembras de estos dos grupos fueron capaces de alcanzar un TC similar en el momento del parto, un elevado número de gazapos destetados (tras el ajuste de camadas) y una menor tasa de mortalidad en lactación. En esta línea, Rommers et al. (2004a) describieron que un descenso moderado de la ingesta energética no afecta a la tasa de implantación, mientras que, en la cuarta semana de gestación, la privación de energía puede generar más problemas a largo plazo.

Estudios previos del grupo (García-García *et al.*, 2021a; 2021b) se centraron en las posibles consecuencias de una RAM de 3 semanas (el equivalente al grupo R021) sobre la progenie durante la lactación y el desarrollo juvenil, mostrando que la descendencia superviviente no manifestó ninguna alteración reseñable en su crecimiento, parámetros séricos o metabólicos ni en el consumo de alimento entre la fase juvenil y la pubertad.

Sobre los efectos de la RAM sobre la fertilidad y prolificidad de las hembras, no se apreciaron consecuencias en ninguno de los grupos. A pesar de que los pesos de las camadas y la producción de leche fue similar en

todos los grupos, sí que aparecieron diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad de gazapos en los grupos Control y R021. Podría deberse a algún efecto del ajuste de camadas tras el parto, pero es difícil de explicar. Curiosamente, las hembras del grupo R07, a pesar de mostrar una menor viabilidad fetal durante la gestación, registraron un mayor número de destetes y menor mortalidad en gazapos durante la lactación, mejorando los resultados de los demás grupos.

En cuanto a la mortalidad de las hembras durante el estudio (sacrificadas por necesidades del experimento a día 28 de gestación o sacrificadas por otras razones como baja prolificidad, incidencia de abortos, presencia de mastitis o muertes súbitas), los datos recogidos no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales, y se muestran consistentes y coherentes con el histórico de datos de la granja de producción, por lo que se consideran muertes incidentales no relacionadas con las condiciones experimentales.

Respecto a los efectos de la RAM sobre el metabolismo, se analizaron las hormonas tiroideas como medio para evaluar la adaptación del organismo a la reducción del consumo de energía en la dieta debida a la restricción. En general, las conejas que más tiempo estuvieron restringidas presentaron menores concentraciones de T_3. Durante las tres primeras semanas de gestación, se observó un descenso tanto de la T_3 como de la T_4, junto con un repunte tras la realimentación *ad libitum* de los animales. La significación estadística de la interacción entre el tratamiento (RAM) y el tiempo observada en las concentraciones plasmáticas de T_3 se debe a que el grupo R021 presentó los valores más bajos de T_3 a día 21 de gestación, momento en el cual llevaban tres semanas de restricción consecutivas. Sin embargo, hacia el final de la gestación todos los grupos mostraron concentraciones de T_3 similares. El descenso de T_3 libre durante periodos de restricción de alimento normalmente reduce la tasa metabólica del organismo, lo cual se traduce en un ahorro de energía para los animales (Menchetti *et al.*, 2015), pero de todas las hormonas involucradas con el metabolismo, la T_3 es la que más rápidamente se recupera (Brecchia *et al.*, 2006). Por lo tanto, en la cuarta semana de gestación y durante la lactación, con todos los grupos alimentándose *ad libitum*, se restauró el equilibrio en el balance energético de las hembras y por lo tanto de la T_3. Las concentraciones plasmáticas de T_4 durante la lactación aumentaron significativamente en comparación con las registradas en gestación, indicando por tanto una recuperación total del metabolismo energético tras la RAM.

El estudio de la relación entre los perfiles de insulina y glucosa de los animales de este estudio sugiere que las hembras, sujetas a RAM en la primera mitad de gestación, lograron aprovechar la energía aportada tanto en la dieta como la de sus reservas corporales. La insulina es una hormona intermediaria en el metabolismo, relacionada con muchas rutas metabólicas que mantienen la homeostasis energética coordinando diferentes

ejes y sistemas (Hornick *et al.*, 2000, Rommers *et al.,* 2004b), pero no debe olvidarse que se trata de una hormona que sufre modificaciones postprandiales. Por ello es de reseñar que a día 14 de gestación los grupos Control y R07, que llevaban siendo alimentados *ad libitum* desde el principio y desde el día 7 de la gestación respectivamente, presentaron un aumento de la insulina que puede deberse a la ingesta reciente de alimento. Posteriormente, en el día 21 de gestación, la insulina aumenta su concentración y se manifiesta una resistencia a la insulina con el aumento del índice HOMA-IR en estos grupos, evento que Menchetti *et al.* (2015) describen como una adaptación a la demanda de energía producida por el crecimiento fetal. Continuando con esta dinámica, las menores concentraciones de insulina plasmática del día 21 de gestación en los grupos R721 y R021 reafirman el papel de la insulina en el engranaje del metabolismo, dado que Buczkowska y Jarosz-Chobot (2001) aseveraron, al igual que otros autores (Rommers *et al.*, 2004b), que la reducción de insulina en plasma promueve la lipólisis, lo cual tiene sentido debido a que las hembras de estos grupos experimentales llevaban sujetas a RAM dos y tres semanas, respectivamente, y necesitaban obtener energía de sus reservas corporales para suplir su falta en la dieta. Por otro lado, Fortun-Lamothe (2006) describió que los fetos demandan grandes cantidades de glucosa hacia el final de la gestación y, por lo tanto, como la RAM finalizó en la cuarta semana de gestación, las hembras de los grupos R721 y R021 aumentaron significativamente su consumo de alimento para compensar el tiempo de restricción al que habían sido sometidas. Esto explicaría el aumento en la concentración de glucosa plasmática observada principalmente en el grupo R021, que fue el grupo restringido durante más tiempo.

Además, los resultados del índice HOMA-IR mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales hacia el final de la gestación (día 28), especialmente en R021, que experimentó un marcado aumento en estos valores, mientras que los otros grupos no sobrepasaron el límite para considerar la existencia de resistencia a la insulina (R01 y R721). Esto pudo deberse a al consumo de glucosa continuado de los fetos, el cual obliga a la madre a aumentar la producción hepática de glucosa durante el ayuno para mantener las necesidades energéticas de los tejidos dependientes de glucosa (García-Benasach, 2012), lo que también explicaría el ligero, pero no significativo aumento de glucosa en el grupo R021 el día 28 de gestación. Como las concentraciones de NEFA circulantes no fueron lo suficientemente elevadas en R021 en este momento para considerar que hubo movilización de reservas, se podría asumir que la principal fuente de glucosa en esta etapa radicaba en la energía obtenida de la dieta, que ya era proporcionada *ad libitum* en todos los grupos experimentales.

En el ser humano y otras especies, la segunda mitad de la gestación está definida por un aumento progresivo de resistencia a la acción de la insulina, por lo que en el tercer trimestre la sensibilidad a la insulina es de 1/3 de la normal, y los niveles de insulina en sangre se incrementan hasta 4 veces su valor normal (Buchanan *et*

al., 1990; Père y Etienne, 2007). Este periodo se corresponde en nuestro estudio aproximadamente con la tercera y cuarta semanas de gestación. Otros autores han obtenido estos mismos datos y resultados en conejos (Menchetti *et al.*, 2020), lo cual aporta solidez a los resultados de este estudio.

Como muestran los resultados, la RAM durante la gestación afectó al balance energético general de las hembras y la elevación de las concentraciones plasmáticas de NEFA son una manifestación de la movilización de reservas corporales. La RAM de este estudio tuvo efectos significativos sobre las concentraciones de NEFA circulantes, siendo los mayores valores los observados en el día 14 de gestación de las hembras sujetas a un mayor periodo de restricción. Estos datos concuerdan con los de otros autores, que determinaron mayores concentraciones plasmáticas de NEFA en hembras sujetas a RAM entre ligera y moderada en periodos similares de la gestación a los empleados en este estudio (Menchetti *et al.*, 2015; Martínez-Paredes *et al.*, 2012). Asimismo, las concentraciones más bajas de NEFA encontradas el día 14 de gestación en los grupos Control y R07 aportan consistencia a la afirmación anterior, que sugiere una redirección del metabolismo energético hacia una menor lipólisis debida al aumento de la energía aportado con la dieta en estos grupos.

En lo que respecta al periodo de lactación, las principales diferencias entre grupos se dieron en cuanto a las concentraciones plasmáticas de T_3 entre hembras gestantes y no gestantes, presentando éstas últimas los valores más bajos. Teniendo en cuenta que la tercera IA se llevó a cabo el día 14pp, los niveles más elevados de T_3 en hembras gestantes y lactantes a la vez se pueden explicar por el papel de la T_3 en la síntesis de tejidos, sobre todo en la primera mitad de la gestación (Habeeb *et al.*, 1991). De hecho, Bober *et al.* (1980) aportaron evidencias de que las hormonas tiroideas están implicadas en el metabolismo celular de la glándula mamaria y la utilización de energía, lo cual es un factor importante a la hora del desarrollo fetal durante la gestación y la biosíntesis de leche. Esto es relevante para el presente estudio, ya que las hembras gestantes de la tercera IA se encontraban lactantes de forma simultánea. Es de interés destacar el ligero descenso de la insulina y el índice HOMA-IR del día 14 de gestación en comparación con los niveles del día 7pp, que podría tener su explicación en el estrés que implica la manipulación de los animales para realizar la tercera IA, ya que éste se hace tomando a la coneja de su cubículo y sujetándola por la cola para introducir la cánula de inseminación, además de la inyección intramuscular de GnRH para inducir la ovulación que produce un leve dolor en el momento del pinchazo. La explicación está en que, en momentos de estrés, los niveles de insulina caen, aumenta la liberación de glucagón y epinefrina (que se metaboliza y genera adrenalina) y se libera glucosa desde el hígado (Ganong, 1998).

Como se muestra en las figuras 6G y 6H, la RAM no supuso diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de TG y CHO entre los grupos experimentales durante la gestación, sino que las diferencias

se encuentran a lo largo del tiempo de experimento. Los niveles de TG en sangre fueron mayores en los días 14 y 21 de gestación de manera general en todos los grupos, reduciéndose drásticamente a día 28 de gestación. Esto ilustra la movilización de reservas corporales para el mantenimiento de la gestación y el desarrollo fetal, y por lo tanto el consumo de energía, reflejando el rápido uso de los TG por parte del hígado una vez ingeridos en la dieta. Además, se debe tener en cuenta que, en una gestación a término, la mayor parte del espacio disponible a nivel abdominal se encuentra ocupado por el útero grávido, disminuyendo la capacidad de ingesta de la madre (Partridge et al., 1986b; Maertens, 1992). En particular, el grupo R721, y en menor medida el grupo R021, a día 14 de gestación presentaron un aumento considerable de los niveles plasmáticos de TG, coincidiendo con los niveles de insulina más bajos registrados en todo el experimento. Barrows y Parks (2006), determinaron que los ácidos grasos se emplean como fuente de triglicéridos aprovechables a nivel hepático en condiciones de ayuno, debido a que las bajas concentraciones de insulina que se producen cuando la ingesta de energía se reduce, activan la lipólisis en el tejido graso. Estos datos confirman que la homeostasis energética se mantiene en nuestras condiciones experimentales incluso con las RAM más acusadas. A día 28 de gestación, momento en el que prácticamente ha concluido el desarrollo fetal, los niveles reducidos de TG circulantes sugieren un consumo menor y por lo tanto menor movilización de los depósitos grasos de las madres, mostrando a su vez un aumento de los niveles de insulina.

En cuanto al CHO durante la gestación, el análisis estadístico reveló una tendencia a presentar diferencias entre el grupo Control y R021 (P=0,0591) en relación a los niveles de colesterol en sangre. La mayor divergencia entre grupos se aprecia en el día 14 de gestación, lo cual sugiere una movilización de reservas grasas y síntesis de colesterol de novo para cubrir las necesidades fetales (Christenson et al., 2003) y el mantenimiento del CL tras las primeras semanas de RAM, especialmente en los grupos R721 y R021. Esto apunta a que una RAM de mayor duración sí hubiera afectado negativamente a las madres en términos de recuperación de la condición corporal o capacidad de regulación energética para mantener la demanda que supone el desarrollo fetal en el último tercio de la gestación, sobre todo teniendo en cuenta que es el periodo más demandante a nivel metabólico y que la vía más rápida de obtención del colesterol, como se ha visto anteriormente, es a través de la dieta. Fainaru y Schafer (2000), en un estudio sobre ayuno prolongado, determinaron que los sujetos que partían de una condición corporal y un perfil lipídico adecuados, no sufrieron variaciones notables en los niveles plasmáticos de colesterol durante el ayuno. Estos resultados y los niveles de colesterol similares entre grupos, sugieren que, en nuestras condiciones experimentales, las hembras partían de una CC adecuada y un perfil lipídico óptimo al inicio del experimento, por lo cual la homeostasis del colesterol se mantuvo sin variaciones discernibles durante la gestación.

Por tanto, nuestros resultados reflejan el cambio de un estado anabólico al inicio de la gestación a un estado catabólico en el último tercio de la misma, donde la glucosa y los aminoácidos se destinan a cubrir las

necesidades energéticas fetales, y los lípidos son empleados como fuente de energía por la madre (Butte et al., 2007).

En el periodo de lactación (Figuras 6G y GH), a pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas entre grupos, la mayor diferencia en cuanto a los niveles de TG en sangre se encuentra a día 30 de lactación. Al comparar los grupos R721 y R021 con los otros dos, y en particular en el caso de las hembras lactantes pero que no quedaron gestantes en la tercera IA, se observa que los niveles de TG circulantes son menores en estos grupos respecto al grupo Control y R07. Teniendo en cuenta el papel de los TG como precursores de los ácidos grasos y que sus principales reservas se encuentran en el tejido adiposo, sus bajos niveles plasmáticos en este punto sugieren que la gran parte de los TG aportado en la dieta estarían destinándose a la recuperación de las reservas corporales consumidas durante el mantenimiento de la gestación, especialmente en los periodos de RAM, y la lactación (Barrows y Parks, 2006).

Sorprendentemente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales durante la gestación y la lactación debidas a la RAM en cuanto a los niveles de corticosterona, algo inesperado ya que este metabolito se seleccionó para valorar el estrés sufrido por los animales durante el experimento. Algunos autores contemplan que las concentraciones plasmáticas de corticosterona se corresponden más con un estrés metabólico que un estrés puramente comportamental (Martínez-Paredes *et al.*, 2012), lo cual aportaría solidez a la afirmación de que, en este estudio, la RAM es solamente de carácter moderado y no implica un agotamiento metabólico de las hembras, ya que las concentraciones de corticosterona fueron menores hacia el final de la gestación. Por otro lado, Menchetti *et al.*, (2015) registraron los valores de cortisol durante las gestaciones de hembras sometidas a RAM y determinaron que este parámetro no se veía alterado durante la gestación, lo cual puede atribuirse a los cambios en la regulación del organismo que ocurren en la gestación y que favorecen el mantenimiento de los niveles de glucocorticoides esenciales para la maduración de muchos órganos fetales (Brunton *et l.*, 2008; Entringer *et al.*, 2010; Tamashiro *et al.*, 2010; Mastorakos e Ilias, 2003).

No obstante, es interesante señalar que, hacia el final de la lactación, los niveles de corticosterona son mayores que los del día 7pp. Esto podría deberse al tamaño de los gazapos, que hacia el final de la lactación aumenta considerablemente. Éstos comienzan a dejar el nido en torno a los 14-16 días de vida (Szendrö y Trocino, 2019), y algunos autores han descrito que densidades de animales elevadas en el cubículo pueden aumentar los niveles de corticosterona circulantes en sangre (Kalaba, 2012). En estas condiciones experimentales, hacia el final de la lactación hay una media de 10 gazapos por coneja en el cubículo que pesan alrededor de 500g, que ya abandonan el nido y que ocupan mucho del espacio disponible. Además, estos

gazapos continúan intentando mamar, lo cual puede repercutir sobre el confort del a madre y explicar la elevación de la corticosterona. Aun con todo, serían necesarios estudios más en profundidad para corroborar esta hipótesis, dado que el bienestar animal se valora en función de más indicadores aparte de los metabólicos, como por ejemplo parámetros comportamentales sobre los que influyen el manejo, el enriquecimiento ambiental y otros factores, que requieren de estudios específicamente encaminados a su evaluación para poder considerarlos y que quedan fuera de lo analizado en esta Tesis Doctoral.

5. CONCLUSIONES

Este estudio expone que una RAM moderada de alimento (del 60% del consumo voluntario de la hembra) aplicada durante 1, 2 o 3 semanas de gestación, seguida de realimentación *ad libitum*, confirma los hallazgos previos en cuanto al consumo de alimento compensatorio de las madres, que contribuye a preservar la homeostasis energética (hormonas tiroideas, glucosa, e insulina) y el metabolismo lipídico (NEFA, CHO y TG). Esto permite el aporte de energía necesario a los fetos para alcanzar un desarrollo y crecimiento fetal satisfactorios, confirmando los hallazgos de anteriores estudios en los que no se encontraron efectos adversos a largo plazo en los primeros estadios de vida de la descendencia. Asimismo, este consumo compensatorio garantizó el mantenimiento de un rendimiento productivo adecuado de la gestación en curso y mostró no tener efectos negativos en la producción de leche, la viabilidad de las camadas ni la tasa de mortalidad de las hembras.

Además, las concentraciones plasmáticas de corticosterona estudiadas a lo largo de la gestación y la lactación indicaron que, en estas condiciones experimentales, la RAM aplicada parece no inducir estrés en las hembras en los periodos de gestación y lactación contemplados, a expensas de analizar este parámetro en combinación con otros indicadores reconocidos de bienestar animal.
Asimismo, se ha probado que esta estrategia de alimentación puede resultar rentable para los productores, ya que el consumo final total de las hembras de todos los grupos fue menor que el del grupo Control.

En resumen, estos resultados revelan que mientras el aporte de alimento cubra las necesidades de mantenimiento de la hembra y le permita recuperar en cierta medida sus reservas corporales, una RAM es una buena estrategia para reducir los costes de producción, ya que no implica efectos adversos sobre el metabolismo, estado energético y bienestar de las hembras ni el crecimiento pre y post nacimiento de los fetos y las camadas, respectivamente.

5. DISCUSIÓN GENERAL

De los datos obtenidos en el experimento 1, se concluyó que la hipótesis inicial no contempló el mantenimiento de los niveles plasmáticos de PRL en los minutos posteriores al amamantamiento (Fuchs *et al.*, 1984), y que tal vez un muestreo más diferido en el tiempo hubiera permitido detectar variaciones mayores en los niveles de PRL en lactación. También se debe considerar que el rango de gazapos en la camada elegido como de elevada densidad (10-12 gazapos) y baja densidad (7-9 gazapos), no representara una diferencia entre grupos lo suficientemente marcada como para producir estas variaciones. Sin embargo, a nivel productivo en el sector, los reajustes del TC siempre ocurren en un rango comprendido entre los 7 y los 12 gazapos por hembra (Fortun-Lamothe et al., 2000; Pascual *et al*, 2011), por lo que los rendimientos siguen considerándose en un rango deseable para obtener una rentabilidad en la producción, y demostrando además que estas densidades de camada no afectaron negativamente a las hembras en ninguno de los casos en términos de continuidad en su vida reproductiva.

A pesar de ello, sería interesante plantear futuros estudios con diferencias en el tamaño de camada más acusadas y tiempos de muestreo seriados para un mejor seguimiento de los niveles plasmáticos de PRL en las madres. También se podría considerar el estudio de la producción y composición de la leche y si éstas se ven influenciadas en alguna medida por el tamaño de camada, para ampliar la información existente en este campo (Maertens *et al.*, 2006; Kacsala *et al.*, 2015).

Por otro lado, a través del segundo experimento se ha podido estudiar la correlación entre el crecimiento fetal y la disponibilidad de recursos obtenidos a través de la placenta, mostrando que su regulación y señalización metabólica puede verse afectada por estados nutricionales potencialmente deficientes de la madre en función del tipo, duración y severidad, lo cual concuerda con resultados experimentales de otros autores (Belkacemi *et al.*, 2010). Existen estudios que sugieren (Díaz *et al.*, 2014), que en situaciones donde los recursos nutricionales de las hembras son limitados, pero suficientes, la señalización de la demanda fetal predomina sobre la materna en cuanto a la partición de recursos. Además, en casos de desafíos nutricionales más severos o prolongados, la regulación por suministro materno puede anular las señales de demanda fetal para que prevalezcan las necesidades maternas frente a las fetales, pudiendo dar lugar a una interrupción de la gestación.

Gracias a estos datos y los derivados de nuestro segundo experimento, podría decirse que el desarrollo fetal adaptativo respecto a la capacidad de transferencia de nutrientes de la madre es un mecanismo evolutivo que previene el fallo reproductivo y que garantiza la supervivencia de la descendencia que, a pesar de generar individuos de menor tamaño, tienen plena capacidad de reproducción y de desarrollo. También hay autores que argumentan (Gaccioli *et al.*, 2013) que la regulación de los transportadores de nutrientes placentarios

puede constituir un vínculo entre nutrición materna y la epigenética del desarrollo fetal, punto de vista que podría ser de interés para llevar a cabo estudios futuros, donde se profundice el análisis estructural de la placenta y el transporte de nutrientes a los fetos a lo largo de la gestación.

En este sentido, varios autores proponen dos modelos de estudio para el transporte placentario de nutrientes. Por un lado, un modelo de detección placentario de nutrientes (Jansson y Powell, 2006; Rosario *et al.*, 2011), donde la placenta responde a las señales nutricionales maternas, lo que resulta en una disminución de los transportadores de nutrientes placentarios en respuesta a la desnutrición materna y en un flujo sanguíneo útero-placentario restringido. Esto deriva en una menor disponibilidad de nutrientes para los fetos y en un crecimiento intrauterino restringido (López-Tello, 2017). El otro modelo, aunque más estudiado en ratones, es el modelo de demanda fetal (Sibley *et al.*, 2010; Angiolini *et al.*¸2005; Constancia *et al*., 2005), que establece que es el feto el que envía señales a la placenta para regular el crecimiento placentario y el transporte de nutrientes. Este modelo representa un mecanismo homeostático clásico por el cual el feto regula el transporte placentario de forma inversa para compensar cambios en la disponibilidad de nutrientes enviando señales a la placenta para regular homeostáticamente su crecimiento y transporte de nutrientes (Díaz *et al.*, 2014).

En humanos, se han llevado a cabo estudios sobre el transporte placentario de nutrientes tanto en situaciones de crecimiento fetal restringido (Jansson *et al.*, 2002a; 1998; Glazier *et al.*, 1997) como en sitaciones de sobrecrecimiento fetal (Jansson *et al.*, 2002b; 2002c; Kuruvilla *et al.*¸1994). En los primeros se observó una menor expresión de ciertos transportadores de nutrientes, y en los segundos, un aumento de la capacidad transportadora de la placenta, aunque con resultados desiguales según el estudio. Estos hallazgos contradicen, por lo tanto, la suposición de que las señales fetales prevalecen sobre las maternas en el transporte placentario de nutrientes, y apoyan por otra parte que las señales maternas tengan un mayor peso sobre la disponibilidad de recursos que se puede asignar al feto en desarrollo a través de la placenta. Como la mayoría de estos estudios se realizaron en gestaciones prácticamente a término, Díaz *et al.* (2014) plantean que es posible que los cambios compensatorios derivados de la demanda fetal de nutrientes puedan ser apreciados con mejor precisión en etapas más tempranas de la gestación, como ocurre en nuestras condiciones experimentales.

Gaccioli *et al*. (2014) proponen un modelo combinado de los anteriores, en el el que la clave de la regulación del transporte de nutrientes es la propia placenta. Como se ha visto, la absorción y transporte de nutrientes están íntimamente relacionados con el tamaño de la placenta, por lo que es probable que estos dos eventos compartan rutas de señalización metabólica que requieran un estudio más profundo. Sería a través de estas

rutas de señalización que los cambios endocrinos de la placenta en respuesta al estado nutricional de la madre, determinasen la autorregulación del desarrollo placentario y la fisiología de la hembra gestante, añadiendo una mayor complejidad al estudio de la partición materno-fetal de recursos durante la gestación. En cualquier caso, resulta evidente la necesidad de estudios más exhaustivos sobre las funciones placentarias como mecanismo integrador del metabolismo de la madre y del feto y de sus efectos a nivel epigenético en la descendencia.

6. CONCLUSIONES GENERALES

Considerando los resultados obtenidos en los dos experimentos que conforman esta Tesis Doctoral y en las condiciones experimentales de esta investigación, las conclusiones que se pueden aportar son las siguientes:

1. Que las conejas de la línea A de la UPV y primíparas en condiciones comerciales mantienen una adecuada secreción de PRL, LH y P_4 en un amplio rango de tamaños de camada (entre 7 y 12 gazapos), y que su rendimiento productivo y bienestar general en su segunda gestación no se ven afectados significativamente por los ajustes de camada realizados en estos rangos.
2. Que la **Restricción de Alimento Materna** estudiada en esta Tesis Doctoral en conejas en diferentes etapas de su segunda gestación, aunque afectó a ciertos parámetros de biometría fetal y eficiencia placentaria, no supuso un perjuicio para el rendimiento productivo en su segundo ciclo ni para el desarrollo posterior de los gazapos en fase de cebo, gracias a un desarrollo fetal adaptativo en relación a la transferencia de nutrientes a través de la placenta.
3. Que los **tamaños de camada** estudiados en el experimento 1 y la **Restricción de Alimento Materna moderada** aplicada en el experimento 2 no produjeron alteraciones significativas en las concentraciones plasmáticas de **corticosterona** analizadas a lo largo del experimento, manteniéndose además los índices de mortalidad de ambos experimentos en los rangos habituales del histórico de la explotación. Por ello, y a expensas de revisar otros parámetros influyentes, se puede inducir que las condiciones experimentales estudiadas no tuvieron un impacto negativo sobre el bienestar general de las conejas.
4. Que una **Restricción de Alimento Materna moderada** y controlada puede suponer un ahorro en los costes de producción sin afectar significativamente al rendimiento productivo de las conejas reproductoras, dado que el consumo compensatorio tras la restricción no supera los costes de la alimentación *ad libitum*.
5. Que la aplicación del **conocimiento de la fisiología y metabolismo de la especie** es una herramienta de utilidad para llevar a cabo un seguimiento pormenorizado de los ciclos productivos de las conejas sujetas a raciones controladas de alimento, ya que puede respaldar científicamente tanto las técnicas de manejo como las estrategias alimentarias para garantizar el **Bienestar Animal** en las granjas cunícolas.

7. BIBLIOGRAFÍA Y LITERATURA CITADA

Abercrombie H. C., Kalin N. H. 2018. Cortisol and psychopathology: An update on the cortisol awakening response in the context of anxiety disorders. *Biological Psychology, **130**, pp.15-27.*

Adams G.P., Jaiswal R., Singh J., Malhi P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology, **69** (1): pp. 0–80.*

Adamson S. 2002. Interactions between Trophoblast Cells and the Maternal and Fetal Circulation in the Mouse Placenta. *Developmental Biology, **250** (2): 358–373.*

Adeva-Andany M. M., González-Lucán M., Donapetry-García C., Fernández-Fernández C. 2016. Glucose metabolism in humans. *The Journal of clinical and diagnostic research, **10** (6), pp. BE01–BE09.*

Agea I., García M.L., Blasco A., Massányi P., Capcarová M., Argente M.J. 2020. Correlated Response to Selection for Litter Size Residual Variability in Rabbits' Body Condition. *Animals (Basel) **21**; 10(12):2447.*

Aitman T. J., Godsland I. F., Farren B., Crook D., Wong H. J., Scott J., Day I.N. 2000. Regulation of LDL receptor and HMG-CoA reductase genes by SREBPs and SCAP in animal cells. *Progress in lipid research **39**, (2): pp. 243-266).*

Akkuş T, Erdoğan G. 2019. Ultrasonographic evaluation of feto-placental tissues at different intrauterine locations in rabbit. *Theriogenology. **138**: pp. 16-23.*

Al-Khalaifah H. 2020. Modulatory effect of dietary polyunsaturated fatty acids on immunity, represented by phagocytic activity. *Frontiers in Veterinary Science **7** pp.672.*

Alves-Bezerra M., Cohen D.E. 2018. Triglyceride Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology **12**; 8(1): pp.1-8.*

Aneja A., Tierney E. 2008. Autism: the role of cholesterol in treatment. *International Review of Psychiatry **20** (2): pp. 165-170.*

Angiolini E., Coan P.M., Sandovici I., Iwajomo O.H., Peck G., Burton G.J., Sibley C.P., Reik W., Fowden A.L., Constância M. 2011. Developmental adaptations to increased fetal nutrient demand in mouse genetic models of Igf2-mediated overgrowth. *FASEB Journal **25** (5): pp. 1737-1745.*

Angueira A.R., Ludvik A.E., Reddy T.E., Wicksteed B., Lowe W.L. Jr, Layden B.T. 2015. New insights into gestational glucose metabolism: lessons learned from 21st century approaches. *Diabetes, **64** (2): pp. 327-34.*

Arenas J., Ricart W., Fernández-Real J.M. 2008. Metabolismo del colesterol y control del balance energético. *Endocrinology Nutrition **55** (1): pp.22-36.*

Argente M.J., Santacreu M.A., Climent A., Blasco A. 2003. Relationships between uterine and fetal traits in rabbit selected on uterine capacity. *Journal of Animal Science **81**: pp.1265–1273.*

Argente M.J., Santacreu M.A., Climent A., Blasco A. 2008. Effects of intrauterine crowding on available uterine space per fetus in rabbits. *Livestock Science, **114** (2-3), pp. 0–219.*

Argente M.J., García M.L., Birlanga V., Muelas R. 2014. Relationship between cortisol and acute phase protein concentrations in female rabbits. *The Veterinary Journal*, ***202***, *(1): pp. 172-175.*

Argente M. J., García M. L., Zbyňovská K., Petruška P., Capcarová M., Blasco A. 2019. Correlated response to selection for litter size environmental variability in rabbits' resilience. *Animal*, ***13*** *(10), pp. 2348-2355.*

Arias-Álvarez M., García-García M.R., Rebollar P.G., Revuelta L., Millán P., Lorenzo P.L. 2009. Influence of metabolic status on oocyte quality and follicular characteristics at different post-partum periods in primiparous rabbit does. *Theriogenology*, ***72*** *pp. 612-623.*

Arnesto R.A., Díaz J.L.D., Peromingo J.A.D., González A.R., Mao M.C., Martínez F.D.L. 2011. Lípidos, colesterol y lipoproteínas. *Galicia clínica*, ***72****(1), pp. 7-17.*

Aronoff S.L., Berkowitz K., Shreiner B., Want L. 2004. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum*, ***17*** *(3) pp. 183-190.*

Arrington L. R., Kelley K.C. 1984. Producción y Biología de los Conejos Domésticos. *Hemisferio Sur. Buenos Aires. p.253.*

Augustine R.A., Ladyman S.R., Grattan D.R. 2008. From feeding one to feeding many: hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy. *The Journal of Physiology* ***15****: 586 (2): pp. 387-97.*

Baardman M.E., Kerstjens-Frederikse W.S., Berger R.M.F., Bakker M.K., Hofstra R.M.W., Plösch T. 2013. The Role of Maternal-Fetal Cholesterol Transport in Early Fetal Life: Current Insights. *Biology of Reproduction*, ***88****:1 (24) pp. 1-9.*

Bajerska J., Głąbska D., Drzymała-Czyż S. 2015. Dietary and Nutritional Factors in the Etiology and Prevention of Obesity. *Postepy higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, ***69*** *(0), pp. 1089-1107.*

Barrows B.R., Parks E.J. 2006. Contributions of different fatty acid sources to very low-density lipoprotein-triacylglycerol in the fasted and fed states. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* ***91****: pp. 1446–1452.*

Bartels Ä., O'Donoghue K. 2011. Cholesterol in pregnancy: a review of knowns and unknowns. *Obstetric Medicine* ***4*** *(4): pp. 147-51.*

Baselga M., Blasco A., Estany I. 1984. Índice de selection de caracteres reproductivos con información variable. *Proceedings* ***3rd*** *World Rabbit Congress, Rome, Italy, April 4-8, Vol. 1: pp. 62-65*

Bauman D.E, Currie W.B. 1980. Partitioning of Nutrients During Pregnancy and Lactation: A Review of Mechanisms Involving Homeostasis and Homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, ***63*** *(9): pp. 1514-1529.*

Becker D. E. 2019. Basic and clinical endocrinology. *McGraw-Hill Education Medical. Chapter 17 - Diabetes Mellitus, p 249.*

Beckett C., Best L. 1986. The effects of cortisol on protein turnover in skin and skeletal muscle of the pig. *The Journal of Physiology*, ***374****(1), pp. 91-101*.

Belkacemi L., Nelson D.M., Desai M., Ross M.G. 2010. Maternal undernutrition influences placental-fetal development. *Biology of Reproduction* ***83****: pp. 325–331.*

Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. 2002. *Biochemistry (5th ed.). New York: W H Freeman. Capítulo 16: The Citric Acid Cycle.*

Bianco A.C., Silva J.E. 1987. Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation,* ***79*** *(4): pp. 295-300.*

Bianco A.C., Kim B.W. 2006. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *The Journal of Clinical Investigation,* ***116*** *(10): pp- 2571-2579*.

Biolo G., Wolfe R.R. 1993. Insulin action on protein metabolism. *Bailliere's clinical endocrinology and metabolism,* ***7*** *(4), pp. 989-1005*.

Björntorp P. 1992. Hormonal control of regional fat distribution. *Human reproduction (Oxford, England),* ***7*** *(3), pp. 437–444.*

Blasco A., Bidanel J.P., Bolet G., Haley C.S., Santacreu M.A. 1993. The genetics of prenatal survival of pigs and rabbits. *Livestock Production Science* ***37****: pp. 1–21.*

Blasco A., Martínez-Álvaro M., García M.L., Ibáñez-Escriche N., Argente M.J. 2017. Selection for environmental variance of litter size in rabbits. *Genetics Selection Evolution,* ***49*** *(1), pp. 1-8*

Bober M.A., Dollah A., Becker B.A., Johnson H.D. 1980.The influence of exogenous T_3 on plasma prolactin, T_3, TSH and milk production during heat stress in Holstein cows. *Journal of Animal Science,* ***55****: p. 339.*

Bonanno A., Mazza F., Di Grigoli A., Alicata M.L. 2008. Body condition score and related productive responses in rabbit does. *Proceedings of the* ***8th*** *World Rabbit Congress pp. 297-301.*

Braverman L.E., Cooper D.S. 2013. Werner & inbar's the thyroid: a fundamental and clinical text. *Lippincott Williams & Wilkins. Capítulo 131.*

Brecchia G., Bonanno A., Galeati G., Federici C., Maranesi M., Gobbetti A., Zerani M., Boiti C. 2006. Hormonal and metabolic adaptation to fasting: effects on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and reproductive performance of rabbit does. *Domestic Animal Endocrinology,* ***31*** *(2): pp.105-22.*

Brecchia G., Menchetti L., Cardinali R., Polisca A., Troisi A., Maranesi M., Boiti C. 2012. Effects of fasting during pregnancy in rabbit does. *Proceedings of the* ***10th*** *World Rabbit Congress, pp. 341- 345.*

Brent G.A. 2012. Mechanisms of thyroid hormone action. *The Journal of Clinical Investigation,* ***122*** *(7): pp.3035-3043.*

Brizzi P., Tonolo G., Esposito F., Puddu L., Dessole S., Maioli M., Milia S. 1999. Lipoprotein metabolism during normal pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology,* ***181*** *(2): pp.430-434.*

Brunton P.J., Russell J.A., Douglas A.J. 2008. Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. *Journal of Neuroendocrinology,* ***20*** *(6): pp.764-776.*

Buchanan T.A., Metzger B.E., Freinkel N., Bergman R.N. 1990. Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* ***162*** *(4): pp. 1008-14.*

Buczkowska E.O., Jarosz-Chobot P. 2001**.** Insulin effect on metabolism in skeletal muscles and the role of muscles in regulation of glucose homeostasis. *Przeglad Lekarski* ***58*** *(7-8): pp. 782-787.*

Butte N. F. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *American Journal of Clinical Nutrition,* ***71*** *(5) pp.1256(s)–61(s).*

Butte N. F; King J. C. 2005. Energy requirements during pregnancy and lactation. *Public Health Nutrition,* ***8*** *(7a).*

Cahill G.F. 2006. Fuel metabolism in starvation. *Annual Review of Nutrition,* ***26****: pp. 1-22.*

Cannon W.B. 1915. Bodily changes in pain, hunger, fear and rage: an account of recent researches into the function of emotional excitement. *Appleton Company.*

Cappon G.D., Fleeman T.L., Chapin R.E., Hurtt M.E. 2005. Effects of feed restriction during organogenesis on embryo-fetal development in rabbit. *Birth Defects Research part B, Developmental and Reproductive Toxicology,* ***74*** *(5): pp. 424-30.*

Cardona, H. J. C., Echeverri, N. P. 2009. El papel de la insulina en la regulación de la síntesis de proteínas lácteas en bovinos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias,* ***22*** *(4), pp. 597-606*.

Carter A. M. 2007. Animal Models of Human Placentation – A Review. *Placenta,* ***28****: pp. 41–S47.*

Carter A. M. 2012. Evolution of Placental Function in Mammals: The Molecular Basis of Gas and Nutrient Transfer, Hormone Secretion, and Immune Responses. *Physiological Reviews,* ***92*** *(4): pp. 1543–1576.*

Carter A. M., Enders A. C. 2016. Placentation in mammals: Definitive placenta, yolk sac, and paraplacenta. *Theriogenology,* ***86*** *(1), pp. 278–287.*

Cartuche L., Pascual M., Gómez E.A., Blasco A. 2014. Economic weights in rabbit meat production. *World Rabbit Science* ***22****, pp. 165-177.*

Castellini C., Dal Bosco A., Mugnai C. 2003. Comparison of different reproductive protocols for rabbit doe: effect of litter size and re-mating interval. *Livestock Production Science,* ***83****: pp. 131-139.*

Castellini C., 2007. Reproductive activity and welfare of rabbit does. *Italian Journal of Animal Science,* ***6****: pp. 743-747.*

Castellini C., Dal Bosco A., Arias-Álvarez M., Lorenzo P. L., Cardinali R., Rebollar P.G. 2010. The main factors affecting the reproductive performance of rabbit does: a review. *Animal Reproduction Science,* ***122****: pp. 174-182.*

Cha J., Sun X., Dey S.K. 2012. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nature Medicine,* ***18****: pp. 1754–1767.*

Charmandari E., Tsigos C., Chrousos G. 2005 Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology, **67**: pp. 259-84.*

Chavatte-Palmer P., Guillomot M. 2007. Comparative Implantation and placentation. *Gynecologic and Obstetric Investigation **64** (3): pp. 74-166.*

Chiang A., Yang M., Hung J., Chou P., Shyn S., Ng H. 1995. Alterations of serum lipid levels and their biological relevances during and after pregnancy. *Life Science **56**: pp. 2367–2375*

Chopra I.J., Huang T.S. 2012. The thyroid hormone synthesis and its regulation. *The Medical clinics of North America, **96** (2), pp. 297-309.*

Christenson L.K., Devoto L. 2003. Cholesterol transport and steroidogenesis by the corpus luteum. *Reproductive Biology and Endocrinology, **1** (1), pp. 1-9*.

Cioffi, F., Senese, R., Lanni, A., & Goglia, F. 2013. Thyroid hormones and mitochondria: with a brief look at derivatives and analogues. *Molecular and cellular endocrinology, **379** (1-2), pp. 51-61*.

Clark R.L., Robertson R.T., Peter C.P., Bland J.A., Nolan T.E., Oppenheimer L., Bokelman D.L. 1986. Association between adverse maternal and embryo-fetal effects in norfloxacin-treated and food-deprived rabbits. *Fundamental Applied Toxicology. **7** (2): pp. 272-286.*

Cohen D.E., Fisher E.A. 2013. Lipoprotein metabolism, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in Liver Disease **33** (4): pp. 380-388.*

Colditz I. G., Hine B. C. 2016. Resilience in farm animals: biology, management, breeding and implications for animal welfare. *Animal Production Science **56**, pp. 1961-1983.*

Constância M., Angiolini E., Sandovici I., Smith P., Smith R., Kelsey G., Dean W., Ferguson-Smith A., Sibley C. P., Reik W., Fowden A. 2005. Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the Igf2 gene and placental transporter systems. *Proceedings of the Nature Academy of Science of the United States of America, **102** (52), pp. 19219–19224.*

Cuevas Alvarez J. 1985. La reproducción en la coneja. *Revista Cunicultura, **10** (54): pp. 43-52.*

Curi R., Lagranha C.J., Doi S.Q., Sellitti D.F., Procopio J., Pithon- Curi T.C., Corless M. 2005. Molecular mechanisms of fatty acid oxidation and regulation in liver. *Microscopy research and technique, **68** (4), pp. 250-258.*

Dal Bosco A., Rebollar P.G., Boiti C., Zerani M., Castellini C. 2011. Ovulation induction in rabbit does: Current knowledge and perspectives. *Animal Reproducion Science, **129** (3-4): pp. 106–117*.

De Blas C., Taboada E., Mateos G.G., Nicodemus H., Méndez, J. 1995. Effect of substitution of starch for fibre and fat isoenergetic diets on nutrient digestibility and reproductive performance of rabbits. *Journal of Animal Science, **73**: pp.1131–1137.*

De la Fuente L.F., Rosell J.M. 2012. Body weight and body condition of breeding rabbits in commercial units. *Journal of Animal Science, **90**: pp. 3252–3258*.

Díaz P., Powell T.L., Jansson, T. 2014. The role of placental nutrient sensing in maternal-fetal resource allocation. *Biology of Reproduction* ***91*** *(4): p. 82.*

El-Desoky N.I.; Hashem N.M.; Elkomy A.G., Abo-Elezz Z.R. 2022. Improving Rabbit Doe Metabolism and Whole Reproductive Cycle Outcomes via Fatty Acid-Rich Moringa oleifera Leaf Extract Supplementation in Free and Nano-Encapsulated Forms. *Animals* ***12****: p. 764.*

Elenkov I. J, Chrousos G.P. 2002. Stress Hormones, Proinflammatory and Antiinflammatory Cytokines, and Autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences,* ***966****: pp.290-303.*

Elshani B., Kotori V., Daci A. 2021. Role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetes, maternal and fetal insights: current use and future directions. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* ***34*** *(1): pp. 124-136.*

Emery R.S., Liesman J.S., Herdt T.H. 1992. Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. *Journal Of Nutrition,* ***122*** *(3 Suppl): pp. 832-837.*

Enders A.C., Schlafke S. 1971. Penetration of the uterine epithelium during implantation in the rabbit. *American Journal of Anatomy,* ***132****: pp. 219-239.*

Enders A.C., King B.F. 1991. Early stages of trophoblastic invasion of the maternal vascular system during implantation in the macaque and baboon. *Amercian Journal of Anatomy,* ***192****: pp.329–346.*

Entringer S., Buss C., Shirtcliff E.A., Cammack A.L., Yim I.S., Chicz-DeMet A., Sandman C.A., Wadhwa P.D. 2010. Attenuation of maternal psychophysiological stress responses and the maternal cortisol awakening response over the course of human pregnancy. *Stress.* ***13*** *(3): pp. 258-68.*

Estany J., Baselga M., Blasco A., Camacho J. 1989. Mixed model methodology for the estimation of genetic response to selection in litter size of rabbits. *Livestock Production Science,* ***21****: pp.67-76.*

Fainaru M., Schafer Z.2000. Effect of prolonged fasting on plasma lipids, lipoproteins and apolipoprotein B in 12 physicians participating in a hunger strike: an observational study. The Israel Medical Association Journal. **2** (3): pp. 215-219.

Fernández-Pacheco C., Millán P., Rodríguez M., García-García R.M., Sánchez-Rodríguez A., Arias-Álvarez M., Lorenzo P.L., Rebollar P.G. 2019. Indicadores metabólicos y de estrés tras el ajuste de consumo en conejas primíparas gestantes. *44 Symposium de Cunicultura. Aranda de Duero. España, pp. 33-36*

Fortun-Lamothe L., Rochambeau H., Lebas F., Tudela F. 2000. Influence of the number of suckling young on reproductive performance in intensively rabbit does. *Proceedings of the* ***7th*** *World Rabbit Congress, Valencia (Spain) 4-7 July A. pp. 125-132.*

Fortun-Lamothe L. 2006. Energy balance and reproductive performance in rabbit does. *Anim Reproduction Science* ***93*** *(1-2): pp. 1-15.*

Freeman M.E., Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews.* ***80*** *(4): pp. 1523-1631.*

Fromentin C., Tomé D., Nau F., Flet L., Luengo C., Azzout-Marniche D., Sanders P., Fromentin G., Gaudichon C. 2013. Dietary proteins contribute little to glucose production, even under optimal gluconeogenic conditions in healthy humans. *Diabetes* ***62*** *(5): pp. 1435-1442.*

Fuchs A.R., Cubile L., Dawood M.Y., Jørgensen F.S. 1984. Release of Oxytocin and Prolactin by Suckling in Rabbits throughout Lactation. *Endocrinology*, ***114*** *(2): pp. 462–469.*

Gaccioli F., Lager S., Powell T.L., Jansson T. 2013. Placental transport in response to altered maternal nutrition. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* ***4****: pp. 101–115.*

Ganong W.F. 1998. The stress response: A dynamic overview. *Hospital Practice* ***23****: pp. 155-171*.

García M.L., Muelas R., Argente M.J., Peiró R. 2021. Relationship between Prenatal Characteristics and Body Condition and Endocrine Profile in Rabbits. *Animals (Basel),* ***6****; 11 (1): p. 95.*

Garcia-Benasach F. 2012. Diabetes gestacional análisis de la influencia de parámetros clínicos y ecográficos en los resultados perinatales. *Doctoral Thesis, Autonomic University of Madrid, Madrid.*

García-García R.M., Arias-Álvarez M., Millán P., Rodríguez M., Sánchez-Rodríguez A., Lorenzo P.L., Rebollar P.G. 2021a. Gestation Food Restriction and Refeeding Compensate Maternal Energy Status and Alleviate Metabolic Consequences in Juvenile Offspring in a Rabbit Model. *Nutrients,* ***13****, p. 310.*

García-García R.M., Arias-Álvarez M., Rodríguez M., Sánchez-Rodríguez A., Formoso-Rafferty N., Lorenzo P.L., Rebollar P.G. 2021b. Effects of feed restriction during gestation on maternal reproductive outcome and IGF system expression associated with offspring performance in rabbit. *Animal* ***15****: (11): pp. 100-182*.

Gardner D.G., Shoback D. 2011. Greenspan's basic and clinical endocrinology. *McGraw-Hill Education*.

Glazier J.D., Cetin I., Perugino G., Ronzoni S., Grey A.M., Mahendran D., Marconi A.M., Pardi G., Sibley C.P. 1997. Association between the activity of the system A amino acid transporter in the microvillous plasma membrane of the human placenta and severity of fetal compromise in intrauterine growth restriction. *Pediatric Research* ***42****: pp. 514–519.*

Godfrey K.M., Barker D.J. 2001. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutrition*, **4** (2b): *pp.611-624.*

Goldstein J.L., Brown M.S. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature,* ***343*** *(6257): pp. 425-430.*

Gomez-Sanchez C. E., Gomez-Sanchez E. P. 2014. The multifaceted mineralocorticoid receptor. *Comprehensive Physiology*, ***4****(2): pp. 965-994.*

González-Mariscal G., McNitt J.I., Lukefahr S.D., 2007. Maternal care of rabbits in the lab and on the farm: endocrine regulation of behavior and productivity. *Hormonal Behaviour* ***52****: pp. 86–91.*

González-Mariscal G., Lemus A.C., Vega-González A., Aguilar-Roblero A. 2013. Litter size determines circadian periodicity of nursing in rabbits. *Chronobiology International.* ***30****: pp. 711-718.*

González-Mariscal G., Caba M., Martínez-Gomez M., Bautista A., Hudson R. 2016. Mothers and offspring: the rabbit as a model system in the study of mammalian maternal behavior and sibling interactions. *Hormones and Behavior*, ***77****: pp. 30-41.*

González-Redondo P., Negretti P., Finzi A. 2010. Adoption of kits at different litter sizes in an alternative rabbit rearing system. *Agrociencia* ***44*** *(3): pp. 275-282.*

Gouvêa V.N., Cooke R.F., Marques R.S. 2022. Impacts of stress- induced inflammation on feed intake of beef cattle. *Frontiers in Animal Science* ***3****: (96): 27- 48.*

Govoni K.E. (2022). 210 Restricted Maternal Nutrition: Impacts on Fetal Development and Metabolism in Sheep. *Journal of Animal Science* ***100*** *(1):3 pp. 370-374*

Guyton A. C., Hall J. E. 2015. Tratado de fisiología médica *(****13ª ed****.). Elsevier Health Sciences.*

Habeeb A.A., EI-Masry K.A. 1991. Hormonal pattern in pregnant rabbits and some productive aspects as affected by litter size at birth. *Egyptian Poultry Science Journal,* ***1*** *(1): p. 429.*

Harris L.K., Pantham P., Yong H.E.J., Pratt A., Borg A.J., Crocker I., Westwood M., Aplin J., Kalionis B., Murthi P.2019. The role of insulin-like growth factor 2 receptor-mediated homeobox gene expression in human placental apoptosis, and its implications in idiopathic fetal growth restriction. *Molecular Human Reproduction* ***1****; 25(9): pp. 572-585.*

Hayashi K., Kusakabe K.T., Khan H., Kuniyoshi N., Takeshita A., Hiyama M., Kano K., Kiso Y. 2014. Characteristic patterns of maternal and fetal arterial construction in the rabbit placenta. *Medical Molecular Morphology* ***47****(2): pp. 76-82.*

Helfenstein T., Fonseca F.A., Ihara S.S., Bottós J.M., Moreira F.T., Pott H. Jr., et al. 2011. Impaired glucose tolerance plus hyperlipidaemia induced by diet promotes retina microaneurysms in New Zealand rabbits. *International Journal of Experimental Pathology*, ***92****: pp. 40-49.*

Herrera E. 2000. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *European Journal of Clinical Nutrition*, ***54****: pp: S47–S51.*

Hornick J.L., Van Eenaeme C., Gérard O., Dufrasne I., Istasse L. 2000. Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domestic Animal Endocrinology*, ***19****(2): pp. 121-132.*

Hosokawa H., Taniguchi T., Taniguchi H. 2016. Roles of insulin and its signaling pathways in regulation of hepatic glucose uptake and metabolism. *World Journal of Gastroenterology*, ***22****(37): pp: 8405–8416.*

Hua C., Buttgereit F., Combe B.G. 2020. Glucocorticoids in rheumatoid arthritis: current status and future studies. *RMD Open*, ***6****(1), e000536.*

Hudson R., Distel H. 1989. Temporal pattern of suckling in the rabbit pups: a model of circadian synchrony between mother and young. *Research in Perinatal Medicine*, ***9*** *(5): pp. 83-102*.

Hufnagel A., Dearden L., Fernandez-Twinn D.S., Ozanne S.E. 2022. Programming of cardiometabolic health: the role of maternal and fetal hyperinsulinaemia. *Journal of Endocrinology* ***5****;253(2): pp. R47-R63.*

Informe sobre usos de animales en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia durante 2021. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021.*

Jansson T., Scholtbach V., Powell T.L. 1998. Placental transport of leucine and lysine is reduced in intrauterine growth restriction. *Pediatric Research* ***44****: pp. 532–537.*

Jansson T., Ylven K., Wennergren M., Powell T.L. 2002a. Glucose transport and system A activity in syncytiotrophoblast microvillous and basal plasma membranes in intrauterine growth restriction. *Placenta* ***23****: pp. 392–399.*

Jansson N., Rosario F.J., Gaccioli F., Lager S., Jones H.N., Roos S., Jansson T., Powell T.L. 2002b. Activation of placental mTOR signaling and amino acid mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Molecular Cell Biology* ***22****: pp. 5575–5584.*

Jansson T., Ekstrand Y., Bjorn C., Wennergren M., Powell T.L. 2002c. Alterations in the activity of placental amino acid transporters in pregnancies complicated by diabetes. *Diabetes* ***51****: pp. 2214–2219.*

Jansson, T., Powell, T. L. 2006. IFPA 2005 Award in Placentology Lecture. Human placental transport in altered fetal growth: does the placenta function as a nutrient sensor? -- a review. *Placenta,* ***27*** *(A): pp. S91–S97.*

Jilge B., Kuhnt B., Landerer W., Rest S. 2000. Circadian thermoregulation in suckling rabbit pups. *Journal of Biological Rhythms,* ***15****: pp. 329–335.*

Kalaba Z.M. 2012. Physiological Response and Stress Indicators of California Rabbits under Intensive Conditions in Egypt. *Asian Journal of Poultry. Science* ***6****: pp. 65-78.*

Kampe, J., Tschöp, M., Horvath, T. L., Widmer, P. 2015. Neuroendocrine Integration of Body Weight Regulation.

Kant G.J., Lenox R.H., Bunnell B.N, Mougey E.H., Penington L.L., Meyerhoff J.L. 1983. Comparison of stress response in male and female rats: Pituitary cyclic AMP and plasma prolactin, growth hormone and corticosterone. *Psychoneuroendocrinology,* ***8****(4): pp. 421-428.*

Kacsala L., Matics Z., Kasza R., Zsolt G., Szendrő Z. 2015. Milk supply of rabbit kits. *Poljoprivreda/Agriculture.* ***21****: pp. 90-92.*

Koolhaas J.M., Bartolomucci A., Buwalda B., de Boer S.F., Flügge G., Korte S.M., Meerlo P., Murison R., Olivier B., Palanza P., Richter- Levin G., Sgoifo A., Steimer T., Stiedl O., van Dijk G., Wöhr M., Fuchs E. 2011. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews,* ***35****: pp. 1291-1301.*

Kothandapani A., Jefcoate C.R., Jorgensen J.S. 2021. Cholesterol Contributes to Male Sex Differentiation Through Its Developmental Role in Androgen Synthesis and Hedgehog Signaling. *Endocrinology* ***1*** *;162(7): p.66.*

Kültz D. 2020. Defining biological stress and stress responses based on principles of physics. *Journal of Experimental Zoology*, ***333****: pp. 350– 358.*

Kuruvilla A.G., D'Souza S.W., Glazier J.D., Mahendran D., Maresh M.J., Sibley C.P. 1994. Altered activity of the system A amino acid transporter in microvillous membrane vesicles from placentas of macrosomic babies born to diabetic women. *Journal of Clinical Investigation*, ***94****: pp. 689–695*

Lebas F. 1972. Effect de la simultanéité de la lactation et de la gestation sur les performances laitieres chez la lapine. *Annales de Zootechnie*, ***21****: pp. 129-131.*

Lebas F., Marionnet D., Henaff R. 1991. La Production du Lapin. *Tec & Doc Lavoisier. Association Francaise de Cuniculture. París. p. 214.*

León N.M., Torres N., Tovar A.R. 2002. Mecanismo de acción de las proteínas que se unen a los elementos regulatorios de esteroles (SREBPs) en la biosíntesis del colesterol y ácidos grasos. *Revista de Investigación Clínica*, ***54****(2): pp. 145-153.*

Liefeld A.E., Mitchell M., Govoni K.E., Vonnahme K.A., Grazul-Bilska A.T., Swanson K.C., Zinn S.A., Reed S.A. 2019. PSIV-8 Effects of restricted maternal nutrition and re-alimentation on fetal muscle development from mid to late gestation in sheep. *Journal of Animal Science*, ***97****: pp. 224-225*.

Lincoln D.W. 1974. Suckling: a time constant in the nursing behaviors of the rabbit. *Phisiology and Behavior*, ***13****: pp. 711-714.*

Lodish H., Berk A., Zipursky S.L. 2000. Beta Oxidation of Fatty Acids Produces Acetyl-CoA. *Molecular Cell Biology.* ***4th*** *edition. New York: W. H. Freeman. Section 30.3*

López J.M. 2007. Bioquímica. Barcelona: Elsevier España. *Capítulo* ***23****: Metabolismo de los lípidos. Sección 23.4: Biosíntesis del colesterol. pp 438-443.*

López-Tello J., Arias-Álvarez M., Jiménez-Martínez MA., Barbero-fernábdez A., García García R.M., Rodríguez M., Lorenzo P.L., Torres-Rovira L., Astiz S., González-Bulnes A., Rebollar P.G. 2016. The effects of sildenafil citrate and haemodynamics in a rabbit model of intauterine growth restriction. *Reproduction Fertility and Development*, ***29*** *(6): pp. 1239-1248.*

López-Tello J., Arias-Álvarez M., Jiménez-Martínez M.A., García-García R.M., Rodríguez M., Lorenzo P.L., Bermejo R., González-Bulnes A., Rebollar P.G. 2017. Competition for materno-fetal resource partitioning in a rabbit model of undernourished pregnancy. *PLoS ONE*, ***12*** *(1): e0169194*.

Maertens L., 1992. Rabbit nutrition and feeding: a review of some recent developments. *Journal of Applied Rabbit Research*, ***15****. 889: pp. 9-13*

Maertens L., Luzi F., Grilli C. 1995. The effects of PMSG induced oestrus on the performances of rabbit does: a review. *World Rabbit Science* ***3****: pp. 191–199.*

Maertens L., Lebas F., Szendrő Z. 2006. Rabbit milk: A review of quantity, quality and non-dietary affecting factors. *World Rabbit Science.* ***14****: pp. 205-230.*

Maertens L. 2010. Feeding systems of intensive Productions. *Nutrition of the rabbit, **2nd** edition. C. de Blas and J. Wisseman eds. © CAB International 2010, pp. 253-266.*

Manal A.F., Tony M.A., Ezzo O.H. 2010. Feed restriction of pregnant nulliparous rabbit does: consequences on reproductive performance and maternal behaviour. *Animal Reproduction Science, **120**: pp. 179-186.*

Manteca X, Mainau D., Temple D. 2013. Estrés en animales de granja: concepto y efectos sobre la producción. *Farm Animal Welfare Education Centre, **6.***

Marelli B. E., Díaz P. U., Amweg A. N., Rey F., Salvetti N. R., Ortega H. H. 2013. Mecanismo de acción de las gonadotrofinas sobre el ovario bovino y su participación en la enfermedad quística ovárica. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias **12** (1 - 2).*

Márquez-Velasco R., Fernández C. 2016. Colesterol: su importancia en la fisiología y patología del ser humano. *Acta Pediátrica de México, **37** (5): pp. 340-348.*

Martínez-Gómez M., Juárez M., Distel H., Hudson R. 2004. Overlapping litters and reproductive performance in the domestic rabbit. *Physiology of Behaviour **30**-82(4): pp. 629-636.*

Martínez-Paredes E., Ródenas L., Martínez-Vallespín B., Cervera C., Blas E., Brecchia G., Boiti C., Pascual J. 2012. Effects of feeding programme on the performance and energy balance of nulliparous rabbit does. *Animal **6**: pp. 1086–1095.*

Marquis G. S., Penny M. E., Zimmer J. P., Díaz J. M., Marín R. M. 2003. An Overlap of Breastfeeding during Late Pregnancy Is Associated with Subsequent Changes in Colostrum Composition and Morbidity Rates among Peruvian Infants and Their Mothers. *The Journal of Nutrition, **133**(8): pp. 2585–2591.*

Masamizu Y., Ohtsuka T., Takashima Y., Nagahara H., Takenaka Y., Yoshikawa K., Okamura H., Kageyama R. 2006. Real-time imaging of the somite segmentation clock: revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells. *Proceedings of the Nationcal Academy of Science USA, **31**; 103(5): pp.1313-1318.*

Mastorakos G., Ilias I. 2003. Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Annals of the New York Academy of Sciences, **997**: pp.136-1349.*

Mattioli S., Maranesi M., Castellini C., Bosco A., Arias-Alvarez M., Lorenzo P., Rebollar P.G., Garcia-Garcia R. 2021. Physiology and modulation factors of ovulation in rabbit reproduction management. *World Rabbit Science. **29:** pp. 221-229.*

Matsuoka T., Mizoguchi Y., Serizawa K., Ishikura T., Mizuguchi H., Asano Y. 2006. Effects of stage and degree of restricted feeding on pregnancy outcome in rabbits. *Journal of Toxicology Science, **31**(2): pp. 169-175.*

McEwen B. S. 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological Reviews, **87** (3): pp. 873-904.*

McGowen M.R., Erez O., Romero R., Wildman D.E. 2014. The evolution of embryo implantation. *International Journal of Developmental Biology **58** (2-4): pp. 155-161.*

McNeilly A.S., Friessen H.G. 1978. Prolactin during pregnancy and lactation in the rabbit. *Endocrinology, **102**: pp. 1548–1554.*

Menchetti L., Brecchia G., Canali C., Cardinali R., Polisca A., Zerani M., Boiti C. 2015. Food restriction during pregnancy in rabbits: effects on hormones and metabolites involved in energy homeostasis and metabolic programming. *Research in Veterinary Science, **98**: pp.7-12.*

Menchetti L., Andoni E., Barbato O., Canali C., Quattrone A., Vigo D., Codini M., Curone G., Brecchia G. 2020. Energy homeostasis in rabbit does during pregnancy and pseudopregnancy. *Animal Reproduction Science, **218**: 106-505.*

Minuti A., Bani P., Piccioli-Cappelli O., Uboldi O., Bacciu N., Trevisi E. 2015. Metabolic and biochemical changes in plasma of the periparturient rabbit does with different litter size. Animals, **9**, (4): 614-621.

Mocé M.L., Santacreu M.A., Climent A., Blasco A. 2004. The effect of divergent selection for uterine capacity on prenatal survival in rabbits: maternal and embryonic genetic effects. *Journal of Animal Science, **82** (1): pp. 68-73.*

Molina M.T., Vázquez C.M., Ruiz-Gutierrez V. 1991. Metabolismo del colesterol, su regulación a nivel hepático e intestinal. *Grasas y aceites, **42** (4): pp. 298-308.*

Mondin C., Trestini S., Trocino A., Di Martino G. 2021. The Economics of Rabbit Farming: A Pilot Study on the Impact of Different Housing Systems. *Animals (Basel), **23**; 11(11): pp.30-40.*

Mossman H.W.1987. Vertebrate fetal membranes. Rutgers University Press; New Brunswick, NJ.

Mozaffarian D. 2016. Dietary and policy priorities for cardiovascular disease, diabetes, and obesity: a comprehensive review. *Circulation, **133** (2): pp. 187-225.*

Muelas R., Cano P., García M.L., Esquifino A. Argente M.J. 2008. Influence of FSH, LH and Prolactin on the components of litter size in rabbit does. *Proceedings of **9**th World Rabbit Congress, June 10-13, Verona Italy, pp. 405-409.*

Müller-Wieland D., Diederich S. 2019. The Role of Insulin Resistance in the Development of Cardiovascular Disease. *Deutsches Ärzteblatt International, **116**(16): pp. 279-286.*

Mullur R., Liu Y.Y., Brent G.A. 2014. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiology Reviews, **94**(2): pp.355-382.*

Murray R.K., Bender D.A., Botham K.M., Kennelly P.J., Rodwell V.W., Weil P.A. 2018. *Harper's illustrated biochemistry. McGraw-Hill Education.*

Nafeaa A., Ahmed S.A.E., Fat Hallah S. 2011. Effect of feed restriction during pregnancy on performance and productivity of New Zealand white rabbit does. *Veterinary Medicine International Article ID 839737, 5 pages.*

Nakrani M. N., Wineland R. H., Anjum F. 2020. Physiology, Glucose Metabolism. *StatPearls Publishing.*

Nishimoto K., Rainey W. E. 2008. Steroidogenic enzyme expression in the human adrenal gland: adrenarche and adrenopause. *Annals of the New York Academy of Sciences,* ***1135*** *(1): pp. 27-35.*

Omar M.A., Mohamed F., Ahmed El-said Amer N. 2022. Economic Study of Litter Size in New Zealand White Rabbits. *Zagazig Veterinary Journal,* ***50****(1): pp. 62-72.*

Oscoz Arriezu A. 2014. Costes de producción cunícula y sus márgenes. *Revista Cunicultura 226.*

Parigi-Bini R., Xiccato G., Cinetto M., Dalle Zotte A. 1992. Energy and protein utilization and partition in rabbit does concurrently pregnant and lactating. *Animal Production,* ***55****(1): pp. 153-162.*

Partridge G., Lobley G., Fordyce R. 1986a. Energy and nitrogen metabolism of rabbits during pregnancy, lactation, and concurrent pregnancy and lactation. *British Journal of Nutrition,* ***56****(1): pp. 199-207.*

Partridge G. G., Daniels Y., Fordyce R.A. 1986b. The effects of energy intake during pregnancy in doe rabbits on pup birth weight, milk output and maternal body composition change in the ensuing lactation. *The Journal of Agricultural Science,* ***107****: pp. 697–708.*

Pascual M., Serrano P., Torres C., Gómez E.A. 2001. Algunos conceptos para la mejora de la rentabilidad en explotaciones cunícolas *Boletín Cunicultura 166.*

Pascual J.J., Savietto D., Cervera C., Baselga M. 2013. Resources allocation in reproductive rabbit does: a review of feeding and genetic strategies for suitable performance. *World Rabbit Science,* ***21****: pp. 123–144.*

Patel J., Landers K., Li H., Mortimer R.H., Richard K. 2011. Thyroid hormones and fetal neurological development. *Journal of Endocrinology* ***209*** *(1): pp.1-8.*

Pemberton H.N., Franklyn J.A., Kilby M.D.2005. Thyroid hormones and fetal brain development. *Minerva Ginecology,* ***57*** *(4): pp.367-78.*

Père M.C., Etienne M. 2007. Insulin sensitivity during pregnancy, lactation, and postweaning in primiparous gilts. *Journal of Animal Science* ***85*** *(1): pp.101-110.*

Poigner J., Szendro Z., Lévai A., Radnai I., Biró-Nemeth E. 2000. Effect of birth weight and litter size on growth and mortality in rabbits. *World Rabbit Science* ***8****, (1): pp. 17-22.*

Rainforth M. 2019. Effect of maternal nutrition on fetal development and offspring growth in beef cattle.

Real J.T., Ascaso J.F. 2021 Lipid metabolism and classification of hyperlipaemias. *Clinical Investigation in Arteriosclerosis.* ***33*** *(1): pp. 3-9.*

Rebollar P.G., Ubilla E., Alvariño J.M.R. 1994. Grouping of rabbit reproduction management by means of artificial insemination. *World Rabbit Science,* ***2****: pp. 87-91.*

Rebollar P.G., Milanés A., Pereda N., Millán P., Cano P., Esquifino A.I., Villarroel M., Silván G., Lorenzo P.L. 2006. Oestrus synchronisation of rabbit does at early post-partum by doe–litter separation or ECG injection: Reproductive parameters and endocrine profiles. *Animal Reproduction Science,* ***93*** *(3-4): pp. 218-230.*

Rebollar P.G., Bonanno A. Di Grigoli G. Tornambe G., Lorenzo P.L. 2008. Endocrine and ovarian response after a 2-day controlled suckling and eCG treatment in lactating rabbit does. *Animal Reproduction Science, **104**: pp. 316–328.*

Rebollar P.G., Pérez-Cabal M.A., Pereda N., Lorenzo P.L., Arias-Álvarez M., García-Rebollar P. 2009. Effects of parity orderand reproductive management on the efficiency of rabbit productive systems. *Livestock Science Journal, **121**: pp. 227-233.*

Rebollar P.G., Velasco B., Cosat R., Lorenzo P.L., García-Rebollar P. 2009b. Influencia de la edad y del estado fisiológico sobre la composición corporal de conejas en sistemas extensivos de cubrición y destete. ***34** Symposium de Cunicultura, ASESCU, Sevilla, Spain, pp.187–192.*

Rebollar P.G., Pereda N., Schwarz B.F., Millán P., Lorenzo P.L., Nicodemus N. 2011. Effect of feed restriction or feeding high-fibre diet during the rearing period on body composition, serum parameters and productive performance of rabbit does. *Animal Feed Science and Technology, **163** (1): pp. 67–76.*

Rebollar P.G., Dal Bosco A., Millán P., Cardinali R., Brecchia G., Sylla L., Lorenzo P.L., Castellini C. 2012. Ovulating induction methods in rabbit does: The pituitary and ovarian responses. *Theriogenology, **77** (2): pp. 292-298.*

Rebollar P. G., García-García R. M., Arias-Álvarez M., Millán P., Rey A. I., Rodríguez M., García-Rebollar P. 2014. Reproductive long-term effects, endocrine response and fatty acid profile of rabbit does fed diets supplemented with n-3 fatty acids. *Animal Reproduction Science, **146** (3-4): pp. 202–209.*

Redmer D.A., Wallace J.M. Reynolds L.P. 2004. Effect of nutrient intake during pregnancy on foetal and placenta growth and vascular development. *Domestic Animal Endocrinology, **27** (3): pp. 199 – 217.*

Rhen T., Cidlowski J.A. 2005. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *The New England Journal of Medicine, **353**: pp. 1711-1723*

Rodríguez M., Garcia-Garcia, R.M., Arias-Álvarez M, Formoso-Rafferty N., Millán P., López-Tello J., Lorenzo P., Gonzalez-Bulnes A., Rebollar P. 2017a. A diet supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids influences the metabolic and endocrine response of rabbit does and their offspring. *Journal of Animal Science, **95**: pp. 2690-2700.*

Rodríguez M., Arias-Álvarez M., Formoso-Rafferty N., Velasco B., Sánchez A., Lorenzo P.L., García-García R.M., Rebollar P.G. 2017b. Consecuencias de una restricción de la alimentación durante la gestación de la coneja sobre el crecimiento fetoplacentario. ***42** Symposium de Cunicultura ASESCU. Murcia. Spain, pp. 40-44.*

Rodríguez M., García-García R.M., Arias-Álvarez M., Millán P., Febrel N., Formoso-Rafferty N., López-Tello J., Lorenzo P.L., Rebollar P.G. 2018. Improvements in the conception rate, milk composition and embryo quality of rabbit does after dietary enrichment with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Animals, **12** (10): pp. 2080-2088.*

Rommers J.M., Kemp B., Meijerhof R., Noordhuizen J.P.T.M. 2001. The effect of litter size before weaning on subsequent body development, feed intake, and reproductive performance of young rabbit does. *Journal of Animal Science*, ***79****: pp. 1973–1986.*

Rommers J.M., Meijerhof R., Noordhuizen J.P., Kemp B. 2004a. The effect of level of feeding in early gestation on reproductive success in young rabbit does. *Animal Reproduction Science*, ***81*** *(1-2): pp.15115-8.*

Rommers J., Boiti C., Brecchia G., Meijerhof R., Noordhuizen J., Decuypere E., Kemp B. 2004b. Metabolic adaptation and hormonal regulation in young rabbit does during long-term caloric restriction and subsequent compensatory growth. *Animal Science* ***79*** *(2): pp. 255-264.*

Richter H.G.; Hansell J.A.; Raut S.; Giussani D.A. 2009. Melatonin improves placental efficiency and birth weight and increases the placental expression of antioxidant enzymes in undernourished pregnancy. *The Journal of Pineal Research*, ***46****: pp. 357–364.*

Robinson J. S., Owens J. A., and Owens P. C. 1994. Fetal growth and growth retardation. *Textbook of Fetal Physiology, G. D. Thorburn and R. Harding, Eds. Oxford University Press, New York, NY, USA, pp. 83–94.*

Roque-Jiménez J.A., Rosa-Velázquez M., Pinos-Rodríguez J.M., Vicente-Martínez J.G., Mendoza-Cervantes G., Flores-Primo A., Lee-Rangel H.A., Relling A.E. 2021. Role of Long Chain Fatty Acids in Developmental Programming in Ruminants. *Animals (Basel)* ***10****; 11(3): p.762.*

Rosario F. J., Jansson N., Kanai Y., Prasad P. D., Powell T. L., Jansson T. 2011. Maternal protein restriction in the rat inhibits placental insulin, mTOR, and STAT3 signaling and down-regulates placental amino acid transporters. *Endocrinology*, ***152*** *(3): pp. 1119–1129.*

Russell J.A., Douglas A.J., Ingram C.D. 2001. Brain preparations for maternity – adaptive changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation. An overview. *Progress in Brain Research* ***133****: pp. 1–38.*

Saavedra O. M., Sánchez I. R., Sánchez J. R. G., Reyes G. M. C., Bolaina E. M. 2012. Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas,* ***43*** *(2): pp. 7-22.*

Sadler TW. 2011. Langman's medical embryology. 12th edition. Lippincott Williams & Wilkins. 400p.

Sakr O.G., García-García R.M., Arias-Álvarez M., Lorenzo P.L., Millán P., Velasco B., Rebollar P.G. 2012. Métodos de sincronización de celo en conejas primiparas lactantes a 25 días post-parto. *Revista Comlutense de Ciencias Veterinarias*, ***6*** *(1).*

Sánchez-Margalet V., Vallejo-Vaz A. J. 2018. Triglicéridos: ¿Más allá de la dislipemia? *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis,* ***30*** *(2): pp. 76-84.*

Sanders M. A. 2005.William Cowper and his decorated copperplate initials. *The Anatomical Record Part B: The New Anatomist.* ***282B*** *(1): pp. 5-12.*

SAS Institute. 2001. SAS/STAT® User's Guide (Release 8.2). SAS Inst. Inc., Cary NC, USA.

Seggie J.A., Brown G.M. 1975. Stress response patterns of plasma corticosterone, prolactin and growth hormone in the rat, following handling or exposure to novel environment. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, ***53*** *(4): pp. 629-637.*

Selye H A. 1936. Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* ***138****: pp. 32-33.*

Sibley C.P., Brownbill P., Dilworth M., Glazier J.D. 2010. Review: Adaptation in placental nutrient supply to meet fetal growth demand: implications for programming. *Placenta,* ***31*** *(Suppl): pp. S70–S74.*

Soenke M., Jacob A., Ronald O.B. 2005. Using net energy for diet formulation. Potential for the Canadian pig industry. *Advances in Pork Production,* ***16****: pp.119-129.*

Spencer T.E., Johnson G.A., Bazer F.W., Burghardt R.C., Palmarini M. 2007. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction Fertility and Development,* ***19****: pp. 65–78.*

Stagnaro-Green A., Abuhamad A. 2016. Thyroid disease in clinical practice. *Springer. Capítulo "Anatomy and Physiology of the Thyroid gland", p. 5.*

Sterba O. 1995. Staging and Ageing of Mammalian Embryos and Fetuses. *Acta Veterinaria Brno - ACTA VET BRNO.* ***64.***

Swanson K.C., Reiners J.N. 2020. 143 Nutritional advances in fetal and neonatal development: amino acid supplementation. *Journal of Animal Science,* ***98****: pp. 122-122.*

Szendro Z., Maertens L. 2001. Maternal effect during pregnancy and lactation in rabbits (a review). *Acta Agraria Kaposváriensis* ***5*** *(2): pp. 1-21.*

Szendrő Z., Trocino A., Hoy S., Xiccato G., Villagrá A., Maertens L. 2019. A review of recent research outcomes on the housing of farmed domestic rabbits: reproducing does. *World Rabbit Science,* ***27*** *(1): pp. 1-14.*

Talayero B. G., Sacks F. M. 2011 Triglycerides and atherosclerosis. *Atherosclerosis reviews, pp. 161-178. Springer.*

Tajonar K., Gonzalez-Ronquillo M., Relling A., Nordquist R.E., Nawroth C., Vargas-Bello-Pérez E. 2023. Toward assessing the role of dietary fatty acids in lamb's neurological and cognitive development. *Frontiers in Veterinary Science,* ***10****: 1081141.*

Tamashiro K.L., Moran T.H. 2010. Perinatal environment and its influences on metabolic programming of offspring. *Physiology of Behaviour,* ***14****; 100 (5): pp. 560-566.*

Theau-Clément, M. 2007. Preparation of the rabbit doe to insemination: a review. *World Rabbit Science,* ***15****: pp. 61 – 80.*

Tortora G.J., Derrickson B.H. 2017. Principles of Anatomy and Physiology. *John Wiley & Sons, pp 322-323.*

Tudela V. 2008. El colesterol: lo bueno y lo malo. *Secretaría de Educación Pública.*

Ubilla E., Alvariño J.M.R., Esquifino A., Agrasal C. 1992. Effects of induction of parturition by administration of a prostaglandin F2α analogue in rabbits: possible modification of prolactin, LH and FSH secretion patterns. *Animal Reproduction Science, **27** (1): pp. 13-20.*

Ubilla E., Rebollar P.G., Pazo D., Esquifino A., Alvariño J.M.R. 2000a. Effects of doe–litter separation on endocrinological and productivity variables in lactating rabbits. *Livestock Production Science **67** (1–2): pp. 67-74.*

Ubilla E., Rebollar P.G., Pazo D., Esquifino A., Alvariño J.M.R. 2000b. Pituitary and ovarian response to transient doe–litter separation in nursing rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility, **118**: pp. 361–366.*

Van Meer G., Voelker D., R. Feigenson G. W. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Materials, **3** (1): pp. 1-16.*

Vickers M.H. 2014. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrition **6**: pp. 2165–2178.*

Wang Y. 2010. Vascular biology of the placenta. *Colloquium series on integrated systems physiology: from molecule to function, **2** (1): pp. 1-98.*

Watlington C. O., Kramer L. B., Schuetz E. G., Zilai J., Grogan W. M., Guzelian P., Schoolwerth A. C. 1992. Corticosterone 6 beta-hydroxylation correlates with blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology, **262** (6): pp. F927-F931.*

Webster J. 2016. Animal Welfare: Freedoms, Dominions and "A Life Worth Living". *Animals, **6**: p. 35.*

Wei X., Tsai T., Howe S., Zhao J. 2021. Weaning Induced Gut Dysfunction and Nutritional Interventions in Nursery Pigs: A Partial Review. *Animals (Basel) **29**; 11(5): p.1279.*

Williamson CS. 2006. Nutrition in pregnancy. *Nutrition Bullettin, **31** (1): pp. 28-59.*

Woodman D. 1997. Reproductive hormones. *Laboratory Animal Endocrinology. Ed Wiley pp 453-499*.

Xiao X. 2000. Study on the mating utilization of the meat rabbit new line A. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences **17**: pp 112-117.*

Xiccato G. 1996. Nutrition of lactating does. *Proceedings of the **6th** World Rabbit Congress, Toulouse, 9-12 July, Vol. 1, pp. 29-47*

Xiccato G., Bernardini M., Castellini C., Dalle Zote A., Queaque P.I., Trocino A. 1999. Effect of post-weaning feeding on the performance and energy balance of female rabbits at different physiological states. *Journal of Animal Science **77**: pp. 416-426.*

Xiccato G., Trocino, A. 2010. Energy and protein metabolism and requirements. *De Blas, C., Wiseman, J. (Eds.), Nutrition of the Rabbit. 2nd ed. CABI, Wallingford, Oxfordshire, UK pp. 83–118.*

Yen C.L. E., Stone S. J., Koliwad S., Harris C. 2012. Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Adipocyte-specific deletion promotes adipose tissue inflammation and Insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry* ***287*** *(9): pp. 6225–6237.*

Zapletal D. 2021. Growth of suckled rabbit kits depending on litter size at birth. *Acta Fytotechnica et Zootechnica,* ***24****: pp. 55-59.*

Zeitoun M. 2017. Is L-arginine or glucose dependence required for fetal growth, survival and maternal progesterone during late pregnancy in ewes? *International Journal of Animal Research,* ***1****: pp. 1-9.*

ANEXO I: PONENCIAS EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

Fernández-Pacheco C., Millán P., Rodríguez M., García-García R.M., Sánchez-Rodríguez A., Arias-Álvarez M., Lorenzo P.L., Rebollar P.G. 2019. Indicadores metabólicos y de estrés tras el ajuste de consumo en conejas primíparas gestantes. 44 Symposium de Cunicultura. Aranda de Duero. España.

Fernández-Pacheco C., Millán P., Rodríguez M., García-García R.M., Sánchez-Rodríguez A., Arias-Álvarez M., Lorenzo P.L., Rebollar P.G. 2020. Influence of maternal feed restriction on glycemic and lipid metabolism during pregnancy of rabbit does. *12th World Rabbit Congres. Nantes. Francia* – **Comunicación aceptada, congreso cancelado por motivos sanitarios.**

Fernández-Pacheco C, Millán P, Velasco B, Rebollar PG. 2020. Hormonas reproductoras en conejas primíparas: ¿influye el tamaño de la camada? *Comunicación libre WebiAsescu 2020. Asociación Española de Cunicultura.*

Fernández-Pacheco C., Millán P., Rodríguez M., Sánchez-Rodríguez A., Arias-Álvarez M., Lorenzo P.L., García-García R.M., Rebollar P.G. 2021. Perfil bioquímico y reproductivo de conejas sometidas a una restricción de alimento durante distintos momentos de la gestación. *XIX Jornadas AIDA sobre Producción Animal. Zaragoza. España.*

ANEXO II: PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL

Fernández-Pacheco C, Millán P, Rodríguez M, Formoso-Rafferty N, Velasco B, Rebollar PG. Pituitary and ovarian hormones: is their plasma concentration affected by litter size in primiparous rabbit does? World Rabbit Sci. 2021, 29: 161-168 doi:10.4995/wrs.2021.15122

Fernández-Pacheco C, Millán P, Rodríguez M, Formoso-Rafferty N, Sánchez-Rodríguez A, Lorenzo PL, Arias-Álvarez M, García-García RM, Rebollar PG. Influence of Different Regimes of Moderate Maternal Feed Restriction during Pregnancy of Primiparous Rabbit Does on Long-Term Metabolic Energy Homeostasis, Productive Performance and Welfare. Animals. 2021; 11(9):2736. https://doi.org/10.3390/ani11092736

World Rabbit Sci. 2021, 29: 161-168
doi:10.4995/wrs.2021.15122
WRSA, UPV, 2003

PITUITARY AND OVARIAN HORMONES: IS THEIR PLASMA CONCENTRATION AFFECTED BY LITTER SIZE IN PRIMIPAROUS LACTATING RABBIT DOES?

FERNÁNDEZ-PACHECO C.*, MILLÁN P.*, RODRÍGUEZ M.†‡, FORMOSO-RAFFERTY N.†, VELASCO B.†, REBOLLAR P.G.†

*Department of Physiology, Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain.
†Department of Agrarian Production, ETSIAAB, Polytechnic University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040, Madrid, Spain
‡Department of R+D & projects, PigCHAMP Pro Europa S.L., Segovia, Spain.

Abstract: Genetic selection in commercial rabbit lines based on litter size has positively improved the number of kits suckling, presumably to weaning. Although it has been proven that the energetic balance of primiparous does is due to the need to satisfy pregnancy, lactation and growth requirements, litter size adjustment from 7 to 12 kits is applied as a routine in commercial rabbit farms. The suckling stimulus provokes a prolactin (PRL) secretion, which in turn can modulate the preovulatory release of luteinising hormone (LH) and, consequently, the ovulatory and productive responses of the does. This study aimed to determine if litter size of prolific primiparous rabbit does during lactation [Group HL, with high litter density (10-12 kits; n=21) and Group LL, with low litter density (7-9 kits; n=29)] influences plasma concentration of PRL. Blood samples from lactating does were taken weekly throughout lactation starting on day 4 post-partum, until day 32 post-partum, before and immediately after suckling. In addition, the does were re-inseminated after weaning (day 32 post-partum), and sampled at 0 and 60 min after induction of ovulation to determine whether litter size affected the peak of LH, progesterone (P4) concentrations and the main productive parameters of their second pregnancy. All hormones were determined by enzyme immunoassay. Statistical analysis of the results revealed that the PRL concentrations of hyperprolific rabbit does before and immediately after a suckling stimulus from 7-9 or 10-12 kits were significanltly different, as we only detected basal levels, with a rise after weaning in both groups. More studies are necessary, delaying blood sampling to later periods of time after the suckling stimulus, in order to conclude whether the peak release of this hormone is altered or not. There were also no differences in plasma LH and progesterone levels after artificial insemination, or in productive performance of these females after their second pregnancy. In conclusion, the litter size adjustment of prolific primiparous rabbits with 7 to 12 kits determines adequate pituitary, ovarian and reproductive responses at second parturition if the does are inseminated after weaning.

Key Words: rabbit, doe, litter size, prolactin, progesterone, LH, productive performance.

INTRODUCTION

Lactation is a critical moment in cuniculture production, as the future viability and performance of the kits are directly influenced by milk intake during their first weeks of life (Lebas, 1972). The onset of maternal behaviour in rabbit does occurs before parturition (progesterone decreases, and oestradiol rises), while oxytocin and prolactin (PRL) are secreted (McNeilly and Friessen, 1978). Hudson and Distel (1989) noted that the nursing events of the does follow a circadian periodicity and occur most frequently between midnight and 4:00 a.m., depending on a threshold of suckling stimulation (González-Mariscal *et al.*, 2013). Circadian rhythms in the doe and her litter are synchronised, so that body temperature of kits rises before suckling, and they are able to anticipate the mother coming, increasing their activity in order to prepare for the competitive situation that suckling represents (Jilge *et al.*, 2000). Oxytocin and

Correspondence: P.G. Rebollar, *pilar.grebollar@upm.es.* Received *February 2021* - Accepted *July 2021.*
https://doi.org/10.4995/wrs.2021.15122

CC BY NC SA

PRL are secreted in high concentrations as a consequence of suckling and, thereby, milk production is also affected by maternal hormonal levels inducted by suction reflex (Freeman *et al.*, 2000), whose magnitude could be different depending on the number of lactating offspring.

Genetic selection programmes for reproductive traits have improved the prolificacy of artificially inseminated (AI) rabbit hybrids used in commercial farms (Pascual *et al.*, 2013). Rabbit females have increased their capability to avail body reserves in order to guarantee their offspring nutrition, although metabolic and inflammatory changes affect them during the lactation period (Minuti *et al.*, 2015). As the doe only has ten mammary glands, the adoption of young kits after parturition to homogenise litter size is routine practice in commercial rabbit farms. This procedure is necessary to ease the load on the most prolific rabbits (Lebas *et al.*, 1991), to reduce the mortality of young rabbits, particularly those with lower birth weight in large litter sizes (Szendrő and Maertens, 2001), and to achieve homogeneous slaughter weights (Arrington and Kelley, 1984). Usually, even in non-industrial farms, the litters can be homogenised to different sizes if necessary, especially from 7 to 9 kits (González-Redondo *et al.*, 2010) or from 10 to 11 kits (Rodríguez *et al.*, 2018).

Furthermore, lactation is a highly challenging period for rabbit does in terms of physiology (Castellini, 2007), particularly in primiparous ones. The feed intake capacity of primiparous does is lower than in multiparous females, creating a negative energy balance in the first lactation that increases replacement rates (Xiccato, 1996). Intensive or semi-intensive reproductive rhythms (AI on day 4 or 11 post-partum) applied to these lactating females leave them unable to cover the needs for lactation and growth (Castellini *et al.*, 2003; Rebollar *et al.*, 2006). Previous studies have shown that applying an extensive production system (AI after weaning) in primiparous rabbit does considerably improves body condition of the does, thus achieving an optimal metabolic state to endure the following pregnancies (Arias-Álvarez *et al.*, 2009; Rebollar *et al.*, 2009).

The reproductive hormone concentrations such as PRL, LH and oestradiol of the rabbit have previously been described at mating (Ubilla *et al.*, 2000a) in lactating females (González-Mariscal *et al.*, 1994; Ubilla and Rebollar, 1995; Ubilla *et al.*, 2000b). In addition, progesterone concentrations have also been occasionally described in certain periods of pregnancy (Ubilla *et al.*, 1992; Rodríguez *et al.*, 2018) and across pregnancy and lactation (González-Mariscal *et al.*, 1994). Plasma concentrations of PRL at mating can affect the ovulation rate (OR) of does, and females with OR>15 corpora lutea have lower PRL and higher LH concentrations than females with OR≤15 (Muelas *et al.*, 2008). However, it has not been studied whether this pituitary response could change in prolific lactating rabbits with a prolificacy higher or lower than ten kits. On the other hand, although the most important physiological roles of PRL in mammals are milk synthesis and mammary gland development, this hormone promotes a great variety of functions because it is not only synthetised in the pituitary gland, but also within the central nervous system, the immune system, the uterus and its associated tissues at conception, and even in the mammary gland itself (reviewed by Freeman *et al.*, 2000). This implies that PRL release can be linked to a plethora of stimuli other than suckling, such as light, variations of day length in seasonal mammals, specific sounds, olfactory stimuli and stress.

Thus, our target was to determine whether a litter size of 7-9 or 10-12 kits during the first lactation of prolific primiparous rabbit females could have any effect on: 1) PRL plasma concentrations before and immediately after suckling, and after weaning. 2) LH and progesterone plasma concentrations after the ovulation induction at second AI after weaning. 3) Productive performance in the second productive cycle.

MATERIAL AND METHODS

The study was performed according to the Spanish Policy for Animal Protection RD533/2013 and specifically assessed and approved by the Polytechnic University of Madrid Committee of Ethics in Animal Research and by the Community of Madrid (PROEX 302/15).

New Zealand x California rabbits were fed *ad libitum* with a commercial diet (2400 kcal of digestible energy/kg, 35% neutral detergent fibre and 16% crude protein, NANTA, Madrid, Spain) throughout the study. The experimental design is shown in Figure 1. At first parturition, in a total of 50 primiparous does, prolificacy (liveborn and stillborn) and litter weight were recorded. These does were allocated into two different experimental groups according to a

litter density adjustment, adding or removing no more than two kits per litter without homogenisation of the kits' weights:

- Group HL (high litter density; n=21): dams with a prolificacy at first parturition of 11.80±0.33 born alive, 0.19±0.09 stillborn and a litter weight of 527.90±17.70 g, whose litter size was adjusted to 10-12 kits.

- Group LL (low litter density; n=29): dams with a prolificacy at first parturition of 9.1±0.45 born alive, 0.34±0.10 stillborn and a litter weight of 430.3±18.6 g, whose litter size was adjusted to 7-9 kits.

Dams and litters were checked daily, recording the number of does or kits dead during the lactation period and the litter weight at weaning.

During lactation, in a random subsample of 12 animals (6 HL and 6 LL) plasma PRL concentrations were measured in blood samples collected from the central ear artery (2.5 mL) with 23 G needles before and after suckling. Plasma was obtained after centrifugation at 1200 *g* for 10 min at 4°C and stored at –20°C until analysed. Samples were taken weekly at day 4, 11, 19, 26 and 32 post-partum. To this end, the nest was closed overnight and reopened after the first sampling, allowing kits to suckle and taking the second sample when it was over. As indicated in previous studies (Fuchs *et al.*, 1984 and Ubilla *et al.*, 2000a), plasma PRL concentrations do not reach peak values until 1-5 min after suckling, which was the time we estimated that sequentially passed since the mothers voluntarily left the nest after suckling, we extracted them from their cage, put them in a block, and finally, obtained the blood sample. In these same 6 animals, in order to maintain the litter size during the study, dead kits were replaced by others of the same age taken from dams of the same farm.

At day 32 post-partum, kits were weaned and, immediately after that, all does were artificially inseminated (AI) with fresh diluted semen (MA 24, Ovejero, León, Spain) and ovulation was induced with gonadorelin (20 µg/doe, i.m.; Inducel-GnRH, Ovejero, León, Spain). At this point, two blood samples were taken at 0 and 60 min after AI from the same 12 rabbit females (6 HL and 6 LL) to determine plasma LH surge, according to the method described by Rebollar *et al.* (2012), and plasma progesterone using a commercial kit (Demeditec Diagnostics GmbH, Germany), respectively. Later, does were sampled again on days 1 and 5 post-weaning or post-AI. Plasma PRL levels were determined in all samples taken throughout the study using a commercial immunoassay kit (Rabbit PRL CEA846Rb, Cloud-Clone Corp, CCC, USA), the detection range of the assay ranging from 2.47 ng/mL to 200 ng/mL, with assay sensitivity 0.92 ng/mL and the inter-assay coefficient of variation (CV) 7.2%. For LH and progesterone, the detection ranges were 5 to 125 ng/mL and 0.3 to 40 ng/mL, the assay sensitivity scores were 0.78 ng/mL and 0.045 ng/mL, and the inter-assay CV were 5.9 and 5.7%, respectively.

After second parturition, the following productive parameters were recorded in both experimental groups: fertility [(number of pregnant does/number of artificially inseminated) x 100)], prolificacy (liveborn and stillborn), litter size and litter weight at weaning.

For the statistical analysis of the results, the SAS software was used (Statistical Analysis System Institute Inc; Cary, NC, USA, 2001). The experimental unit was the rabbit doe. Productive parameters at the end of first lactation (weaned

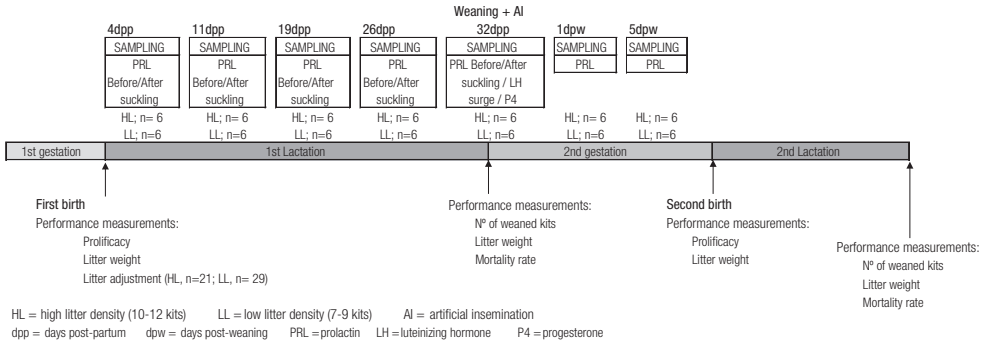


Figure 1: Timeline representation of the experimental design.

kits, litter weight, mortality rate) were analysed considering the litter size adjustment (HL and LL) as the main effect. To study PRL concentrations, a repeated-measures analysis of variance was performed, considering as main effects the treatment (litter size), the time (before and after suckling on days 4, 11, 19, 26, and 32 of lactation, and days 1 and 5 after weaning), and the interaction between both effects. For LH and P4, the main effects considered were the treatment (litter size) and the time (minute 0 and 60 after AI). To analyse productive parameters at second parturition, the main effect considered was the litter size during the previous lactation. If significant main effects were detected, a *t-Student test* was used to compare the means, considering the existence of significant differences for a *P*-value<0.05.

RESULTS

At the end of the first lactation, as a result of litter adjustment, HL does weaned more kits than LL ones (11.22±0.21 and 7.55±0.39 kits, respectively; *P*<0.0001), with higher litter weight (6294±155 and 4655±251 g, respectively; *P*<0.0001), but lighter kits (560.1±15.4 and 637.5±25.9 g, respectively, *P*=0.024). Likewise, the mortality rates at the end of the study were 4.5 and 12.5% of the kits (*P*=0.037) in HL and LL groups, respectively. Furthermore, three does from the HL group and one of the LL group died at the end of the experiment.

The interaction between the two studied effects (litter size and time) on PRL concentrations is shown in Figure 2. During lactation, no significant differences were observed regarding the plasma concentrations of PRL before and immediately after suckling (*P*=0.2520), and the litter size did not affect the plasma concentrations of PRL of the mothers either (*P*=0.7977).

On the other hand, we detected significant differences over time (*P*=0.0003), as in days 1 and 5 after weaning, PRL concentrations in the mothers increased in relation to the pre-weaning period.

Litter size did not affect plasma concentrations of LH (*P*=0.9948) and P4 (*P*=0.8600), but there were differences in relation to the time of sampling (0 *vs.* 60 min after AI) in both hormones (LH; *P*=0.0383 and P4; *P*=0.0138, respectively) (Figure 3).

According to the litter size during the first lactation, results regarding the productive performance of the second productive cycle are shown in Table 1. Litter size did not entail significant differences between groups in any of the productive parameters recorded.

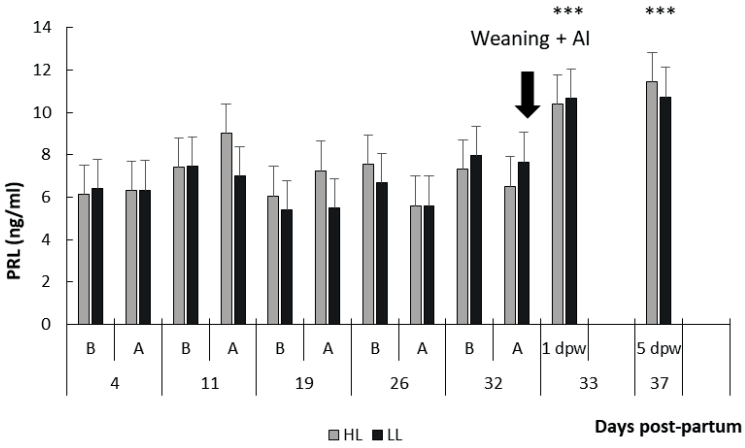


Figure 2: Prolactin (PRL) plasma concentrations before (B) and after (A) suckling of lactating primiparous rabbit does with 10-12 kits (HL; n=6) and 7-9 kits (LL; n=6) and after weaning. AI: artificial insemination. HL: high litter density (10-12 kits). LL: low litter density (7-9 kits). dpw: days post-weaning. ***: *P*=0.0003.

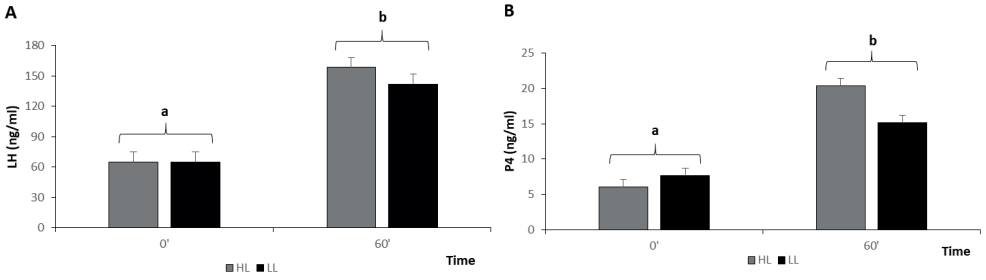


Figure 3: A) Luteinizing hormone (LH) and B) progesterone (P4) plasma concentrations 0 and 60 min after artificial insemination of rabbit does with 10-12 kits (HL; n=6) and with 7-9 kits (LL; n=6) in their previous lactation. a,b: indicate differences between 0 and 60' (P<0.05). HL: high litter density (10-12 kits). LL: low litter density (7-9 kits).

DISCUSSION

The differences in litter size and litter weight at first weaning between HL and LL groups were due to the adjustment applied at the start of the lactation period. Mortality rate of the kits during lactation was higher in the LL than in HL group. Although it would be supposed that in LL group, their feeding might have been better due to a less competition between the kits, Poigner *et al.* (2000) determined that heterogeneous birth weights within the litter could have an important influence on mortality rate of kits during the lactation period. In this sense, in the current study, prior to the adjustment, mean±standard deviation of birth weights of kits from HL does was 45.2±6.86 g and from LL does was 49.1±9.48 g, respectively. This implies that in the current study, by not considering the homogenisation of the weights of the kits within the litter, the mortality rate could be affected between groups beacuse the weight differences between the kits of the LL group was greater than that of the HL group kits.

Concerning the mothers' mortality, it could be due to metabolic diseases. Minuti *et al.* (2015) studied the metabolic and biochemical status of does selected for high prolificacy, comparing two groups of does according to the litter size (with >10 or <10 kits), and observed evident differences between them before parturition, which disappeared 4 and 12 d post-partum. Other authors (Xiccato *et al.*, 1999; Mocé *et al.*, 2004) described that energy depletion in mothers could lead to liver diseases and gestational toxaemia when lactation and gestation overlap. Although it was not the case in our study because does were only lactating, negative energy balance and consequent metabolic disease could explain the death of three does in the HL group, which were probably

Table 1: Productive performance (mean±standard error of mean) at 2nd parturition of rabbits with high (HL: 10-12 kits) and low litter size (LL: 7-9 kits) in their previous lactation and inseminated after weaning.

	HL	LL	*P*-value
n	21	29	
Fertility (%)	66.70±11.29	67.90±9.060	0.9348
Prolificacy			
Liveborn	12.64±0.73	11.44±0.61	0.2177
Stillborn	0.00±0.37	0.81±0.31	0.1068
Weaned	10.64±0.61	10.40±0.51	0.7442
Litter weight (g)			
At birth	786.93±43.72	702.70±36.25	0.1506
At weaning	7562±443.55	7086±350.65	0.4079
Mortality[1] (%)	19.05±7.74	10.71±6.71	0.4200

[1]Percentage of dead kits per litter.

in a more demanding condition than those of the LL group. Primiparous does undergo a complex energy balance between day 25 of gestation and the 3rd day of lactation (Xiccato and Trocino, 2010) which, in healthy animals, should be overcome entirely on day 4 post-partum (de la Fuente and Rosell, 2012). Considering that the deaths of does occurred after weaning in the HL group, it could be assumed that there may be underlying diseases that went unnoticed and did not allow the females a full recovery of their body condition and energy balance during lactation.

The results obtained in this study for PRL concentrations confirm that prolific rabbit females have a similar pituitary response immediately after the suckling stimulus elicited for 7-9 kits or for 10-12 kits. Rebollar *et al.* (2008) determined similar PRL concentrations using transitory separation of the litter 24 h before AI to improve ovarian activity as an oestrus synchronisation method. This procedure does not seem to modify pituitary PRL secretion, nor the apparent synchrony between doe and kits. Besides, Fuchs *et al.* (1984) already determined that while oxytocin levels rise quickly during suckling and decline to basal level shortly thereafter, the increase in plasma PRL concentrations is delayed until 1-5 min after suckling has ceased at the beginning of lactation, and in mid-lactation PRL reaches peak levels which plateau for 2-3 h. Although in the current study the sampling was designed and applied following these premises, we were not able to determine the increase in plasma PRL concentrations cited by Fuchs *et al.* (1984), and only basal levels were detected. Therefore, more studies are needed in which the blood sampling is carried out later with respect to the time of suckling and, in this way, to be able to detect differences in the response of mothers with different numbers of offspring.

An increase in plasma PRL after weaning was observed. If females had been pregnant at weaning (in case AI had been performed after parturition), milk production would have abruptly ceased on day 26 of lactation, and the does would have stopped entering the nest (Lincoln, 1974). However, in the current experiment, lactation and gestation did not overlap, resulting in the continuity of maternal behaviour until day 32 post-partum. According to González-Mariscal *et al.* (2016), maternal conduct continues up to day 40 post-partum if the kits keep suckling. Although in our study the suckling stimulus suddenly disappeared on day 32 post-partum (weaning day), PRL continued to be elevated on days 33 and 37, which suggests that maternal actions would have still been present. On the other hand, it is known that PRL is involved in stressful situations (Seggie and Brown, 1975 and Kant *et al.*, 1983). In the current study, the weaning and AI were applied on day 32 post-partum, and Argente *et al.* (2014) have described high cortisol concentrations in rabbit does at the end of lactation as a stress indicator, which could explain the rise in PRL detected on days 33 and 37.

The preovulatory peak of LH and progesterone concentrations determined after AI were similar to those described in previous experimental studies (Rebollar *et al.*, 2012, 2014). The application of AI post-weaning in primiparous does as previous studies suggest (Arias-Álvarez *et al.*, 2009) has, consequently, afforded a satisfactory productive performance of these prolific primiparous rabbit does, similar to those described in previous works (Rebollar *et al.*, 2008).

CONCLUSIONS

In conclusion, these results suggest that the suckling stimuli of litters with 7-9 or 10-12 kits in primiparous does during the first lactation could have the same consequences on plasma LH and P4 during ovulation, and on productive performance in the second parturition. However, to detect an effective suckling-induced stimulus and evaluate whether differences in litter size are associated (or not) with putative differences in PRL secretion, more delayed periods of sampling after suckling (>5 min) are needed. The main key for a suitable productive performance is the application of an extensive production rhythm which fits the energy needs and physiological situation of prolific lactating rabbits.

Acknowledgements: This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness [Project AGL2015-65572-C2-R1 and Project RTI2018-094404-B-C21].

REFERENCES

Arrington L.R., Kelley K.C. 1984. Producción y Biología de los Conejos Domésticos. *Hemisferio Sur. Buenos Aires. 253.*

Argente M.J., García M.L., Birlanga V., Muelas R. 2014. Relationship between cortisol and acute phase protein concentrations in female rabbits. *The Veterinary Journal, 202: 172-175. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.07.020*

Arias-Álvarez M., García-García M.R., Rebollar P.G., Revuelta L., Millán P., Lorenzo P.L. 2009. Influence of metabolic status on oocyte quality and follicular characteristics at different post-partum periods in primiparous rabbit does. *Theriogenology, 72: 612-623. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.04.017*

Castellini C., Dal Bosco A., Mugnai C. 2003. Comparison of different reproductive protocols for rabbit doe: effect of litter size and re-mating interval. *Livestock Production Science, 83: 131-139. https://doi.org/10.1016/S0301-6226(03)00070-8*

Castellini C. 2007. Reproductive activity and welfare of rabbit does. *Ital. J. Anim. Sci., 6: 743-747. https://doi.org/10.4081/ijas.2007.1s.743*

De la Fuente L.F., Rosell J.M. 2012. Body weight and body condition of breeding rabbits in commercial units. *J. Anim. Sci., 90: 3252-3258. https://doi.org/10.2527/jas.2011-4764*

Freeman M.E., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev., 80: 1523-1631. https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1523*

Fuchs A.R., Cubile L., Dawood M.Y., Jørgensen F.S. 1984. Release of Oxytocin and Prolactin by Suckling in Rabbits throughout Lactation. *Endocrinology, 114: 462-469. https://doi.org/10.1210/endo-114-2-462*

González-Mariscal G., Díaz-Sánchez V., Melo A.I., Beyer C., Rosenblatt J.S. 1994. Maternal beehavior in New Zealand White Rabbis: quantification of somatic events, motor patterns and steroid plasma levels. *Physiol. Behav., 55: 1081-1089. https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90391-3*

González-Mariscal G., Lemus A.C., Vega-González A., Aguilar-Roblero A. 2013. Litter size determines circadian periodicity of nursing in rabbits. *Chronobiol. Int., 30: 711-718. https://doi.org/10.3109/07420528.2013.784769*

González-Mariscal G., Caba M., Martínez-Gomez M., Bautista A., Hudson R. 2016. Mothers and offspring: the rabbit as a model system in the study of mammalian maternal behavior and sibling interactions. *Horm. Behav., 77: 30-41. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.05.011*

González-Redondo P., Negretti P., Finzi A. 2010. Adoption of kits at different litter sizes in an alternative rabbit rearing system. *Agrociencia, 44: 275-282.*

Hudson R., Distel H. 1989. Temporal pattern of suckling in the rabbit pups: a model of circadian synchrony between mother and young. *Res. Per. Med., 9: 83-102.*

Jilge B., Kuhnt B., Landerer W., Rest S. 2000. Circadian thermoregulation in suckling rabbit pups. *J. Biol. Rhythm., 15: 329-335. https://doi.org/10.1177/074873000129001431*

Kant G.J., Lenox R.H., Bunnell B.N., Mougey E.H., Penington L.L., Meyerhoff J.L. 1983. Comparison of stress response in male and female rats: Pituitary cyclic AMP and plasma prolactin, growth hormone and corticosterone. *Psychoneuroendocrinology, 8: 421-428. https://doi.org/10.1016/0306-4530(83)90021-5*

Lebas F. 1972. Effect de la simultanéité de la lactation et de la gestation sur les performance laitieres chez la lapine. *Ann. Zootec., 21: 129-131. https://doi.org/10.1051/animres:19720111*

Lebas F., Marionnet D., Henaff R. 1991. La Production du Lapin. *Tec & Doc Lavoisier. Association Francaise de Cuniculture. París. 214.*

Lincoln D.W. 1974. Suckling: a time constant in the nursing behaviors of the rabbit. *Phisiol. Behav., 13: 711-714. https://doi.org/10.1016/0031-9384(74)90247-9*

Maertens L. 2010. Feeding systems of intensive Productions. In: *Nutrition of the rabbit, 2nd edition. C. de Blas and J. Wisseman eds. © CAB International 2010. 253-266. https://doi.org/10.1079/9781845936693.0253*

McNeilly A.S., Friessen H.G. 1978. Prolactin during pregnancy and lactation in the rabbit. *Endocrinology, 102: 1548-1554. https://doi.org/10.1210/endo-102-5-1548*

Minuti A., Bani P., Piccioli-Cappelli O., Uboldi O., Bacciu N., Trevisi E. 2015. Metabolic and biochemical changes in plasma of the periparturient rabbit does with different litter size. *Animals, 9: 614-621. https://doi.org/10.1017/S1751731114002675*

Mocé M.L., Santacreu M.A., Climent A., Blasco A. 2004. The effect of divergent selection for uterine capacity on prenatal survival in rabbits: maternal and embryonic genetic effects. *J. Anim. Sci., 82: 68-73. https://doi.org/10.2527/2004.82168x*

Muelas R., Cano P., García M.L., Esquifino A., Argente M.J. 2008. Influence of FSH, LH and Prolactin on the components of litter size in rabbit does. *In Proc.: 9th World Rabbit Congress, 10-13 June. Verona Italy. 405-409.*

Pascual J.J., Savietto D., Cervera C., Baselga M. 2013. Resources allocation in reproductive rabbit does: a review of feeding and genetic strategies for suitable performance. *World Rabbit Sci., 21: 123-144. https://doi.org/10.4995/wrs.2013.1236*

Poigner J., Szendrő Z., Lévai A., Radnai I., Biró-Nemeth E. 2000. Effect of birth weight and litter size on growth and mortality in rabbits. *World Rabbit Sci., 8: 17-22. https://doi.org/10.4995/wrs.2000.413*

Rebollar P.G., Milanés A., Pereda N., Millán P., Cano P., Esquifino A.I., Villarroel M., Silván G., Lorenzo P.L. 2006. Oestrus synchronisation of rabbit does at early post-partum by doe-litter separation or ECG injection: Reproductive parameters and endocrine profiles. *Anim. Reprod. Sci., 93: 218-230. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.032*

Rebollar P.G., Bonanno A., Di Grigoli G., Tornambe G., Lorenzo P.L. 2008. Endocrine and ovarian response after a 2-day controlled suckling and eCG treatment in lactating rabbit does. *Anim. Reprod. Sci., 104: 316-328. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.018*

Rebollar P.G., Pérez-Cabal M.A., Pereda N., Lorenzo P.L., Arias-Álvarez M., García-Rebollar P. 2009. Effects of parity order and reproductive management on the efficiency of rabbit productive systems. *Livest. Sci. J., 121: 227-233. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.06.018*

Rebollar P.G., Dal Bosco A., Millán P., Cardinali R., Brecchia G., Sylla L., Lorenzo P.L., Castellini C. 2012. Ovulating induction methods in rabbit does: The pituitary and ovarian responses. *Theriogenology, 77: 292-298. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.041*

Rebollar P.G., García-García R.M., Arias-Álvarez M., Millán P., Rey A.I., Rodríguez M., Formoso-Rafferty N., de la Riva S., Masdeu M., Lorenzo P.L., García-Rebollar P. 2014. Reproductive long-term effects, endocrine profiles of rabbit does fed diets supplemented with n-3 fatty acids. *Anim. Reprod. Sci.*, *146: 202-209. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.021*

Rodríguez M., García-García R.M., Arias-Álvarez M., Millán P., Febrel N., Formoso-Rafferty N., López-Tello J., Lorenzo P.L., Rebollar P.G. 2018. Improvements in the conception rate, milk composition and embryo quality of rabbit does after dietary enrichment with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Animal*, *12: 2080-2088. https://doi.org/10.1017/S1751731117003706*

SAS Institute. 2001. SAS/STAT® User's Guide (*Release 8.2*). *SAS Inst. Inc.*, *Cary NC, USA.*

Seggie J.A., Brown G.M. 1975. Stress response patterns of plasma corticosterone, prolactin and growth hormone in the rat, following handling or exposure to novel environment. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, *53: 629-637. https://doi.org/10.1139/y75-087*

Szendrő Z., Maertens L. 2001. Maternal effect during pregnancy and lactation in rabbits (a review). *Acta Agraria Kaposváriensis*, *5: 1-21*.

Ubilla E., Rebollar P.G. 1995. Influence of the postpartum day on plasma estradiol-17beta levels, sexual behavious, and conception rate, in artificially inseminated lactating rabbits. *Anim. Reprod. Sci.*, *38: 337-344. https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01366-T*

Ubilla E., Alvariño J.M.R., Esquifino A., Agrasal C. 1992. Effects of induction of parturition by administration of a prostaglandin F2α analogue in rabbits: possible modification of prolactin, LH and FSH secretion patterns. *Anim. Reprod. Sci.*, *27: 13-20. https://doi.org/10.1016/0378-4320(92)90066-M*

Ubilla E., Rebollar P.G., Pazo D., Esquifino A., Alvariño J.M.R. 2000a. Effects of doe-litter separation on endocrinological and productivity variables in lactating rabbits. *Livest. Prod. Sci.*, *67: 67-74. https://doi.org/10.1016/S0301-6226(00)00196-2*

Ubilla E., Rebollar P.G., Pazo D., Esquifino A., Alvariño J.M.R. 2000b. Pituitary and ovarian response to transient doe-litter separation in nursing rabbits. *J. Reprod. Fertil.*, *118*: *361-366. https://doi.org/10.1530/jrf.0.1180361*

Xiccato G. 1996. Nutrition of lactating does. *6th World Rabbit Congress, 9-12 July, 1996. Toulousse, France. 1, 29-47.*

Xiccato G., Bernardini M., Castellini C., Dalle Zote A., Queaque P.I., Trocino A. 1999. Effect of post-weaning feeding on the performance and energy balance of female rabbits at different physiological states. *J. Anim. Sci.*, *77: 416-426. https://doi.org/10.2527/1999.772416x*

Xiccato G., Trocino A. 2010. Energy and protein metabolism and requirements. *In: De Blas, C., Wiseman, J. (Eds.), Nutrition of the Rabbit., 2nd ed. CABI, Wallingford, Oxfordshire, UK. 83-118. https://doi.org/10.1079/9781845936693.0083*

animals

MDPI

Article

Influence of Different Regimes of Moderate Maternal Feed Restriction during Pregnancy of Primiparous Rabbit Does on Long-Term Metabolic Energy Homeostasis, Productive Performance and Welfare

Carlota Fernández-Pacheco [1], Pilar Millán [1], María Rodríguez [2,†], Nora Formoso-Rafferty [2], Ana Sánchez-Rodríguez [1,‡], Pedro L. Lorenzo [1], María Arias-Álvarez [3], Rosa M. García-García [1] and Pilar G. Rebollar [2,*]

[1] Department of Physiology, Faculty of Veterinary, Complutense University of Madrid, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain; cafpmartorell@ucm.es (C.F.-P.); pmillanp@vet.ucm.es (P.M.); anasanro.vet@gmail.com (A.S.-R.); plorenzo@vet.ucm.es (P.L.L.); rosa.garcia@vet.ucm.es (R.M.G.-G.)
[2] Department of Agrarian Production, ETSIAAB, Technical University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain; maria.rodriguez@pigchamp-pro.com (M.R.); nora.formosorafferty@upm.es (N.F.-R.)
[3] Department of Animal Production, Faculty of Veterinary, Complutense University of Madrid, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain; m.arias@vet.ucm.es
* Correspondence: pilar.grebollar@upm.es
† Current address: Department of R+D & Projects, PigCHAMP Pro Europa S.L., 40006 Segovia, Spain.
‡ Current address: Department of Biodiversity and Evolutionary Biology, Museo Nacional de Ciencias, Naturales (CSIC), 28006 Madrid, Spain.

check for updates

Citation: Fernández-Pacheco, C.; Millán, P.; Rodríguez, M.; Formoso-Rafferty, N.; Sánchez-Rodríguez, A.; Lorenzo, P.L.; Arias-Álvarez, M.; García-García, R.M.; Rebollar, P.G. Influence of Different Regimes of Moderate Maternal Feed Restriction during Pregnancy of Primiparous Rabbit Does on Long-Term Metabolic Energy Homeostasis, Productive Performance and Welfare. *Animals* **2021**, *11*, 2736. https://doi.org/10.3390/ani11092736

Academic Editor: Víctor Hugo Parraguez Gamboa

Received: 1 September 2021
Accepted: 16 September 2021
Published: 19 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Simple Summary: In rabbit farms, the main production costs come directly from food supplies. Although the reproductive outcomes in this species are acceptable, the results are worse when it comes to primiparous rabbits, so it is recommended that insemination be carried out post-weaning. By avoiding the overlap of the second gestation and the first lactation, better fertility results are expected. Still, despite this, the rabbits garner more adipose tissue than desired, and the productive efficiency deteriorates in the long term. The purpose of this study was to evaluate the influence of different periods of moderate feed restriction (one, two or three weeks) applied during the second pregnancy of primiparous does. We studied fetoplacental development, productive parameters, metabolism and possible stress indicators. Results showed that the voluntary feed intake of dams increased right after feed restriction. No permanent alterations were found in reproductive outcome, metabolism or welfare of does, meaning that this feeding strategy could be successfully applied in rabbit farms.

Abstract: In this study, a maternal feed restriction (MFR; 105 g/d) in primiparous rabbit does was applied from day 0 to 7 post artificial insemination (AI) (R07, n = 96), from day 7 to 21 post AI (R721, n = 92), from day 0 to 21 post AI (R021, n = 94) or fed ad libitum during whole pregnancy (Control, n= 92). Feed intake (FI) was measured after MFR was over. On day 28 of gestation, fetoplacental development was evaluated (n = 11/group) and the productive parameters of the remaining dams were analyzed. Plasma free tri-iodothyronine (T3) and thyroxine, glucose, insulin, non-esterified fatty acids (NEFA), and corticosterone were analyzed during gestation and lactation (n = 5/group). After MFR, all groups significantly increased their voluntary FI. The longer MFR was, the lower the weight and length of the fetuses, but no long-term effects over litter performance were observed. R021 groups had the lowest T3 and the highest NEFA concentrations during pregnancy and showed insulin resistance at the end of gestation, but during lactation, energy homeostasis was balanced in all groups. MFR did not affect corticosterone concentrations. In conclusion, the ration setting applied slightly involved the energy homeostasis and metabolism of the animals, but their overall metabolic condition, productive performance and welfare were not compromised.

Keywords: rabbit; feed intake; free tri-iodothyronine; thyroxine; insulin; glucose; corticosterone; NEFA; fetus; placenta

1. Introduction

In rabbit farms, dam feeding represents roughly a third of the total feed costs (3.7% and 31.7% for replacement and reproductive does, respectively) [1]. Moreover, the number of kits born alive and the feed conversion rate during fattening are of high economic importance. These traits depend directly on maternal nutrition during pregnancy and lactation. Artificial insemination (AI) of does is usually applied on Day 4 or 11 post-partum, while females are lactating [2]. Alternative breeding strategies can be applied to alleviate the negative energy balance that befalls after first parturition with concurrent gestation and lactation of primiparous does, which are still completing their body growth [3]. One of them is delaying the interval parturition-AI until weaning (Day 30 post-partum), applying a reproductive extensive rhythm [4]. This improves reproductive outcome [5], but considering the first weeks of pregnancy do not involve a very high energy expenditure and it is considered an anabolic period [6,7], the important risk of fattening exists due to ad libitum feeding of post-weaning inseminated does. Nonetheless, it is still a critical phase that can influence the rate of embryonic implantation and the development of the placenta, which are limiting factors for good fetal growth. Moreover, the mentioned fattening risk increases if these dams do not become pregnant (pregnancy diagnosis is usually performed on Day 10–14 post AI). Thus, feeding strategies as a subject of study in these animals include applying different levels of maternal feed restriction (MFR) during diverse periods of pregnancy.

MFR has had diverse targets to avoid fattening and high mortality around parturition [8], to determine the competition for materno-fetal resource partitioning [9], to increase voluntary feed intake at the beginning of lactation, or to allow a longer productive life of rabbit does [10]. López-Tello et al. [9,11] verified that undernourishment in dams (50% MFR) during the entire pregnancy or during preimplantation period (1st week) has adverse effects on the fetoplacental unit (reduced fetal crown-rump lengths, asymmetrical growth and high apoptotic rates at the decidua and labyrinth zone). In this sense, it has also been described that if the daily amount of food provided increases to 60% of the dam's total voluntary intake, negative effects are observed only in the second half of gestation. In contrast, if MFR is applied in the first 15 days of pregnancy, no adverse effects are observed on the viability or weight of the kits at birth [12]. Moreover, ad libitum refeeding in the last third of gestation has been shown to improve the energetic status of the mothers before parturition [13], precisely when fetal needs are most significant. It also reduces the negative effects of subsequent lactation on their reproductive function (poor ovulatory response and increased delivery-fertile insemination interval) and improves the weight and viability of the kits.

What we can introduce about the application of MFR is largely based upon our previous experimental studies [14,15], in which we have described the metabolic consequences observed in mothers and offspring subjected to a 60% MFR during three weeks of pregnancy (from day 0 to 21). This MFR led to a compensatory feed intake during the last week of pregnancy that offset the effects in the live body weight (LBW) and body reserves of the dams at parturition and the fetal body weight and phenotype at day 28 of pregnancy. These studies on MFR applied during three weeks of pregnancy have been limited to specific comparisons of the metabolic profiles of mothers and fetuses at a particular moment of gestation (day 28).

Thus, in order to gain further understanding of the metabolic changes and energetic modulations of primiparous does subjected to MFR, the novelty of this study has been to apply shorter and more specific periods of restriction during gestation studying the long-term consequences on additional hormones and metabolites. Among others, thyroid

hormones are key to the regulation of metabolism and adaptation to fasting. They contribute to both mandatory and adaptive thermogenesis, regulating appetite and energy expenditure [16]. On the other hand, glucose is central to energy consumption. Carbohydrates, lipids, and proteins all ultimately break down into glucose, which serves as the main metabolic fuel of mammals' cells and the prevalent fuel of the fetus [17]. Likewise, insulin is a primary anabolic hormone secreted in response to increased blood glucose and amino acids following feeding. The major action of insulin is to stimulate and control glucose consumption and exertion. Like other hormones, insulin performs its activities by binding to specific receptors present on many cells distributed all through the body [18]. Additionally, non-esterified fatty acids (NEFA) concentrations reflect the mobilization of body reserves since they are generated from lipolysis in fatty tissue and are an indicators of negative energy balance [19]. Briefly, the main interest of this study was to measure these metabolic pathways and hormones since they are known to have different behaviors when adapting to the specific needs of gestation, fetal development and milk production [20]. Furthermore, and considering animal welfare standards, food or water deprivation is a procedure that can cause pain or distress [21], making the analysis of stress-related hormones mandatory when a feed restriction is applied. It should be noted that in rabbits and rodents, unlike other mammals, the main glucocorticoid analyzed is usually corticosterone rather than cortisol [22].

Therefore, the main goal of this study was to determine in primiparous lactating does the comparative effect of MFR applied during one, two or three weeks of pregnancy followed by ad libitum refeeding on the feed intake of the dams, feto-placental development on day 28 of pregnancy, productive performance, the weekly plasma concentrations of thyroid hormones and corticosterone, and the glucose and lipid metabolism during pregnancy and consequent lactation.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Design

The animals were housed at the animal facilities of the Technical University of Madrid (Spain), which meet the local, national and European requirements for Scientific Procedure Establishments (RD 53/2013; PROEX 302/15). The experimental design is displayed in Figure 1. New Zealand × California rabbits (18 weeks old), were fed ad libitum during their first pregnancy (length 31 days) and lactation (length 30 days) with a diet containing 16% crude protein, 37% crude fiber, 3.7% fat and 2400 kcal/kg of digestible energy (NANTA, Madrid, Spain). During the first pregnancy, the feed intake of each doe was recorded daily and established in 175 g per animal and day.

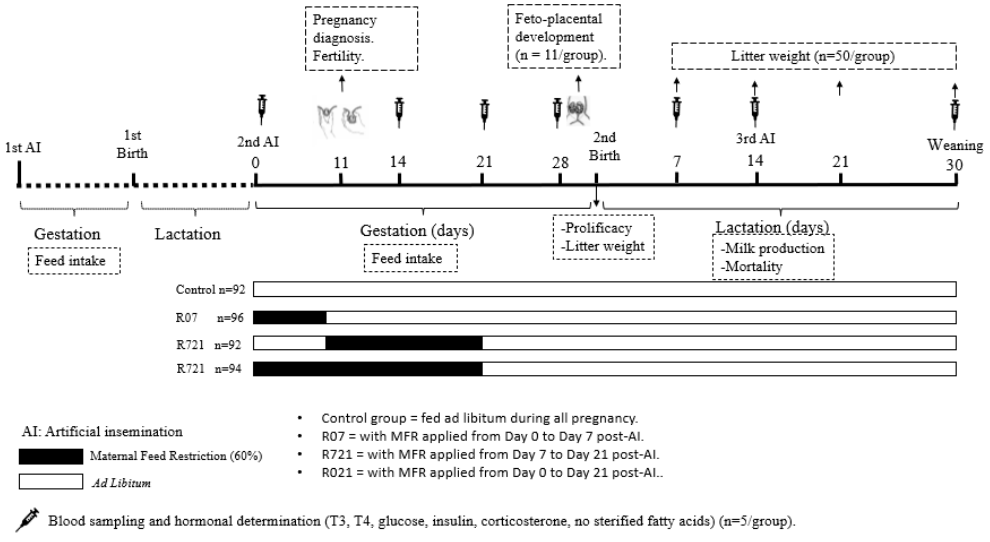


Figure 1. Experimental design.

After parturition and weaning (day 30 post-partum) these does started a second cycle and were artificially inseminated (AI) with fresh diluted semen (commercial extender, MA 24, Ovejero, León, Spain). Each dose contained at least 20 million spermatozoa in 0.5 mL of semen diluent. Ovulation was induced with gonadoreline at the time of AI (20 µg/doe, i.m.; Inducel-GnRH, Ovejero, León, Spain). At this time (day 0), a total of 374 does were randomly allocated into four groups:

- Control group (n = 92) always fed ad libitum.
- R07 (n = 96) with MFR applied from day 0 to day 7 post-AI.
- R721 (n = 92) with MFR applied from day 7 to day 21 post-AI.
- R021 (n = 94) with MFR applied from day 0 to day 21 post-AI.

MFR was set at 60% of the measured voluntary feed intake of the first pregnancy (105 g/day), in order to maintain their basal metabolic needs. In the fourth week of pregnancy, all animals were fed ad libitum until the end of the study. Pregnancy was diagnosed at day 11 post-AI by means of abdominal palpation and fertility ([no. of does pregnant at day 11 after AI/no. of does inseminated] × 100) was calculated. Feed intake was weekly calculated exclusively in the pregnant does from day 0 until the day of parturition.

2.2. Fetoplacental Study

On day 28 of gestation, 44 pregnant does (n = 11 from each group) were weighed and euthanized with an overdose barbiturate (Dolethal, Lab. Vetoquinol, Madrid, Spain) to study fetoplacental development. A ventral laparotomy was performed to count the corpora lutea present in the ovaries and calculate the ovulation rate per animal. Both uterine horns were opened to extract the fetuses and placentas, calculating the rate of viable structures [(number of viable fetuses/number total of fetuses) × 100]. In morphologically viable fetuses, crown–rump length (CRL), biparietal (BPD), occipito-nasal (OND), and thoracic (TD) diameters were measured. Whole fetuses were weighed, and after decapitation, heads and trunks were weighed separately. Fetal organs' (brain, liver, heart, lungs, digestive tract and kidneys) weights and their ratios (organ weight/fetus weight) were calculated to assess fetal growth patterns. Placentas were weighed both as a whole and separately for the maternal (decidua) from the fetal (labyrinth) part. The length, width and thickness of each of the pieces were recorded. Placental efficiency was calculated by dividing the weight of the fetus between the weight of the whole placenta.

2.3. Productive Outcome

The gestation of the remaining rabbit does was carried out, and prolificacy (no. of kits born alive and stillborn per doe) and litter weights at birth were recorded. Litter size was subsequently standardized to 8–12 kits by removing or adding kits within each experimental group.

During lactation, a total number of 50 litters from each experimental group were weighed at day 7, 14 and 21 post-partum. Milk production was estimated using the regression equation developed by Helfenstein et al. [23] as follows: milk production (kg) = 0.75 ± 1.75 LW21 (kg) where LW21 corresponds to litter weight at 21 days of lactation. The day of weaning (day 30 post-partum) the number of weaned kits per doe, litter weight and mortality during lactation period were assessed. At the end of the study, the percentage of culled does (abortions or sudden death) in each experimental group was calculated.

2.4. Long-Term Maternal Metabolic and Hormonal Study

In addition, the evaluation of metabolic and hormonal parameters was carried out on blood samples obtained from the marginal ear vein of randomly chosen females. An initial blood sample was taken at the moment of AI (day 0 of pregnancy) from 10 dams before being allocated into the experimental groups. After pregnancy diagnosis, five pregnant animals per group were sampled at three different moments of gestation: day 14 (n = 20), day 21 (n = 20) and day 28 (n = 20) of gestation. Following parturition, samples were

taken from lactating females (five per group) at three moments of lactation: day 7 (n = 20) and day 14 (n = 20). On day 14 post-partum, all does were re-inseminated as previously described. Then, on day 30 post-partum, weaning was performed and blood samples were taken from pregnant (n = 20) and non-pregnant (n = 20) does from the third AI. Blood samples were placed in tubes with EDTA as an anticoagulant and centrifuged for 15 min at 1200 g to obtain plasma.

Moreover, the evaluation of energetic homeostasis was performed by measuring free triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) in plasma samples using commercial immunoassays (Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany). The assay sensibility was 0.05 pg/mL for both T3 and T4, and the inter-assay and intra-assay variation coefficients were 9.8% and 3.6% for T3 and 4.9% and 3.3% for T4. Glycemic metabolism was assessed by the determination of insulin and glucose levels. Insulin was determined using a commercial immunoassay (Mercodia Ultrasensitive Insulin ELISA, Mercodia AB, Uppsala, Sweden) with an assay sensitivity of 0.071 mU/L and inter-assay and intra-assay variation coefficients of 6.2% and 4.2%, respectively. Insulin sensitivity was calculated by glucose-to-insulin ratio and the homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) using the following equation: [insulin (mU/L) × (glucose (mg/dL)/18)]/22.5 [23]. Low HOMA-IR values (<1.96) indicate high insulin sensitivity, whereas high HOMA-IR values (>3) indicate low insulin sensitivity (insulin resistance). Non-esterified fatty acids (NEFA) were selected as the main indicator of lipid metabolism and were measured using a clinical biochemistry assay (Biolabo SAS, Maizy, France), with detection in the range of 0.01–3.0 mmol/L and assay sensitivity 0.050 mmol/L. Corticosterone was used as a stress indicator [22] and was determined using a commercial immunoassay (Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany). The assay sensitivity was 1.63 nmol/L and the inter-assay intra-assay variation coefficients were 6.5% and 2.8%.

2.5. Statistical Analysis

SAS software (Statistical Analysis System Institute Inc.; Cary, NC, USA, 2001) was used for the statistical analysis of the data. In all analyses, the doe was considered the experimental unit. Differences between groups in the total feed intake were analyzed by a one-way ANOVA (Proc GLM) with the feed regime as the main effect. The effect of MFR on weekly feed intake during gestation was analyzed by repeated measure analysis (MIXED), with feed regime (Control, R07, R721 and R021), time (weeks 1, 2, 3 and 4), and their interaction as main effects. Ovulation rate, live body weight of does, number, weights and measurements of fetuses and placentas, and placental efficiency on day 28 of pregnancy were analyzed (Proc GLM) with feed regime as main effect and considering the litter size as a covariate. With the same procedure, prolificacy and milk production were analyzed with feed regime as the main effect. A chi squared test (Proc CATMOD) was used to evaluate the effect of MFR on fertility and percentage of culled does. Litter weights during the lactation period were analyzed by repeated measure analysis (Proc MIXED), considering the MFR, the time (birth, 7, 14, 21, and 30 days post-partum) and their interaction in the model. For hormonal and metabolic parameters, due to the blood sampling being carried out in independent randomly chosen rabbit does, a GLM procedure was performed, considering as main effects the treatment (MFR), the time (pregnancy: day 14, 21 and 28 of gestation; and lactation day 7, 14 and 30 post-partum), and the interaction between both. If significant main effects were detected, a Tukey test (for parametric variables) or Kruskal–Wallis (non-parametric variables) were used to compare means among groups, considering the existence of significant differences for a p value of less than 0.05. All data are presented as least squares means.

3. Results

3.1. Feed Intake during Pregnancy

As expected, whole feed intake during pregnancy was different between groups ($p < 0.0001$). The Control and R07 groups consumed 5854 ± 124.3 g and 5529 ± 109 g,

respectively, followed by R721 does (4518 ± 112 g) and the R021 group (4007 ± 106.3 g). The weekly evolution of daily feed intake is shown in Figure 2. Interestingly, the week after MFR, we observed that all groups increased their voluntary feed intake, surpassing the control group, like group R07 during the second week, and groups R721 and R021 during the fourth week of pregnancy.

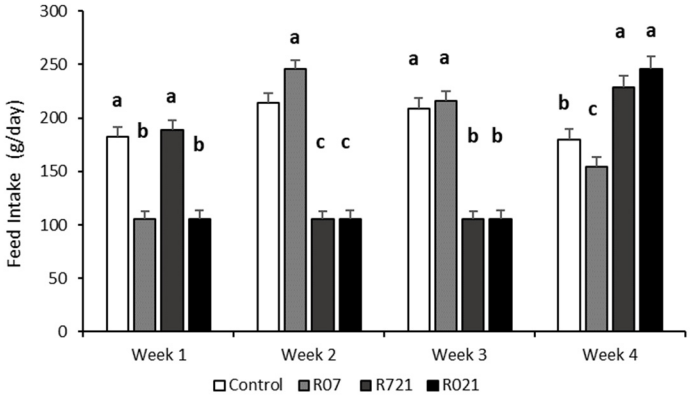


Figure 2. Weekly evolution of the daily feed intake (g/day) in pregnant rabbit does fed ad libitum (Control), restricted to 60% one week from day 0 to 7 (R07), two weeks from day 7 to 21 (R721) and three weeks from day 0 to 21 (R021) of gestation. (a–c): Different letters represent significant differences between experimental groups ($p < 0.0001$).

3.2. Fetoplacental Study

Results obtained on day 28 of pregnancy are shown in Table 1. This table is quite revealing in several ways. First, regarding body reserves of does at the end of pregnancy, does restricted for two weeks (R721) presented a lower LBW than Control and R07 groups ($p = 0.0254$), whereas does restricted for three weeks (R021) had an intermediate body weight.

From a reproductive point of view, the number of corpora lutea, total fetuses per doe, implantation rate and fetal viability were high and similar in all groups. In R07 does, there is a tendency (p = 0.0824) to have more fetuses but with lower viability.

Feed restriction significantly affected ($p < 0.01$) the total, head and trunk weights and CRL of fetuses, being lower in those from R721 and R021 does than in the control group, and intermediate in R07 females. Regarding fetal cephalic diameters, BPD was similar in all groups ($p > 0.05$), however OND was higher in Control and R07 does than in R021, being intermediate in R721 ($p = 0.0032$). Fetal thoracic diameter was greater in R07 compared to the other three groups ($p = 0.0034$). Regarding fetal organs, only liver, lung and kidney weights were different between groups ($p = 0.0097$, $p = 0.0166$, $p = 0.0001$, respectively), with those of the Control group being heavier except for the liver.

Weights and dimensions of labyrinth and decidua from euthanized does at day 28 of pregnancy are shown in Table 2. Regarding these data, it is interesting to indicate that the whole placenta of R07 does weighed more than those from the R721 and R021, and the Control group had an intermediate value ($p < 0.0001$). Furthermore, the labyrinth of R07 does tended to be the heaviest ($p = 0.0809$), whilst that of R021 does was the shortest ($p < 0.0001$) and that from R721 the thinnest ($p < 0.0053$). In does subjected to MFR for two weeks (R721), decidua had lower weight ($p < 0.0001$) than the other three groups. The longest decidua was observed in Control does ($p < 0.0001$) and the thinnest was observed in R721 ($p = 0.0069$). Finally, the lowest placental efficiency was observed in R07 does, the highest in R721, and intermediate in Control and R021 does ($p = 0.0162$).

Table 1. Number and biometric parameters of fetuses of 28 days of gestational age in rabbits fed ad libitum (Control), restricted to 60% one week from day 0 to 7 (R07), two weeks from day 7 to 21 (R721) and three weeks from day 0 to 21 (R021) of gestation.

	Control n = 11	**R07 n = 11**	**R721 n = 11**	**R021 n = 11**	**SEM**	***p* Value**
LBW of does (g)	4638 ^{a}	4640 ^{a}	4342 ^{b}	4413 ^{ab}	80.90	0.0254
Corpora lutea	12.2	12.3	13.1	13.4	0.58	0.4350
Total fetuses/doe	11.7	13.2	12.5	12.5	0.38	0.0814
Implantation rate ^{1} (%)	92.5	97	95.2	91	2.57	0.3684
Fetal Viability ^{2} (%)	94.6	84.9	90.3	90.1	9.13	0.0824
Fetuses weights (g)						
Total	39.7 ^{a}	38.4 ^{ab}	37.4 ^{b}	37.0 ^{b}	1.78	0.0028
Head	9.32 ^{a}	9.06 ^{ab}	8.75 ^{b}	8.71 ^{b}	0.35	0.0001
Trunk	29.0 ^{a}	28.0 ^{ab}	27.0 ^{b}	26.8 ^{b}	1.43	0.0014
Fetuses measures (mm)						
CRL	101.4 ^{a}	99.5 ^{ab}	98.7 ^{b}	98.6 ^{b}	1.83	0.0018
OND	29.0 ^{a}	29.2 ^{a}	28.7 ^{ab}	28.3 ^{b}	0.61	0.0032
BPD	19.3	19.2	19.3	19.0	0.52	0.5801
TD	20.6 ^{b}	21.3 ^{a}	20.8 ^{b}	20.2 ^{b}	0.71	0.0034
Organs weights (g)						
Brain	0.913	0.901	0.892	0.901	0.04	0.6395
Liver	2.64 ^{a}	2.39 ^{b}	2.36 ^{b}	2.39 ^{b}	0.18	0.0097
Heart	0.221	0.207	0.219	0.209	0.02	0.0734
Lungs	0.134 ^{a}	0.126 ^{a}	0.122 ^{b}	0.126 ^{a}	0.08	0.0166
Kidneys	0.359 ^{a}	0.337 ^{ab}	0.323 ^{b}	0.307 ^{b}	0.02	0.0001
Digestive tract	0.208	0.215	0.207	0.197	0.17	0.0952
Ratios						
Brain	0.024	0.024	0.024	0.025	0.00	0.4033
Liver	0.066 ^{a}	0.061 ^{b}	0.064 ^{ab}	0.066 ^{a}	0.00	0.0033
Heart	0.006 ^{a}	0.005 ^{b}	0.006 ^{a}	0.006 ^{a}	0.00	0.0028
Lungs	0.034	0.033	0.033	0.034	0.00	0.0942
Kidneys	0.009 ^{a}	0.009 ^{a}	0.009 ^{a}	0.008 ^{b}	0.00	0.0001
Digestive tract	0.053	0.056	0.056	0.053	0.00	0.1759
Brain: Liver	0.367	0.395	0.400	0.395	0.03	0.2273

LBW: live body weight. ^{1} (number of fetuses/number of corpora lutea) × 100; ^{2} (number of viable fetuses/total number of fetuses) × 100; CRL: crown–rump length; TD: thoracic diameter; BPD: biparietal diameter; OND: occipito-nasal diameter. Data are shown as least squares means. Ratio: organ weight/fetus weight. Values in the same row with different letters are significantly different. SEM: standard error of mean.

Table 2. Weight and dimensions of placentas from pregnant rabbits on day 28, fed ad libitum (Control), restricted to 60% one week from day 0 to 7 (R07), two weeks from day 7 to 21 (R721) and three weeks from day 0 to 21 (R021) of gestation.

	Control n = 11	**R07 n = 11**	**R721 n = 11**	**R021 n = 11**	**SEM**	***p* Value**
Whole placenta (g)	5.16 ^{ab}	5.21 ^{a}	4.60 ^{c}	4.81 ^{bc}	0.30	0.0001
Labyrinth						
Weight (g)	3.27	3.51	3.30	3.33	0.80	0.0809
Length (mm)	37.40 ^{a}	35.80 ^{a}	35.50 ^{a}	33.90 ^{b}	4.28	0.0001
Width (mm)	28.50	28.40	27.70	27.40	3.72	0.1286
Thickness (mm)	5.16 ^{a}	5.17 ^{a}	4.70 ^{b}	5.05 ^{ab}	0.99	0.0053
Decidua						
Weight (g)	1.48 ^{a}	1.55 ^{a}	1.22 ^{b}	1.40 ^{a}	0.11	0.0001
Length (mm)	39.61 ^{a}	37.32 ^{b}	37.30 ^{b}	36.09 ^{b}	1.41	0.0001
Width (mm)	17.84 ^{a}	18.76 ^{a}	16.42 ^{b}	18.39 ^{a}	0.95	0.0001
Thickness (mm)	3.45 ^{a}	3.52 ^{a}	3.11 ^{b}	3.27 ^{ab}	0.26	0.0069
Placental efficiency ^{1}	7.52 ^{ab}	7.34 ^{b}	7.86 ^{a}	7.45 ^{ab}	0.34	0.0162

^{1} Fetus weight/whole placenta weight. Data are shown as least squares means. Values in the same row with different letters are significantly different. SEM: standard error of mean.

3.3. Productive Outcome

Productive outcome is shown in Table 3.

Table 3. Productive parameters of rabbits fed ad libitum (Control), or restricted to 60% of their needs, one week from day 0 to 7 (R07), two weeks from day 7 to 21 (R721) and three weeks from day 0 to 21 (R021) in its second gestation.

	Control n = 92	R07 n = 96	R721 n = 92	R021 n = 94	RMSE	*p* Value
Fertility [1] (%)	71.11	76.04	78.26	78.72		0.6129
Parturitions	59	69	67	68		
Litter size						
Born alive	11.01	10.98	10.05	11.02	3.17	0.2904
Stillborn	0.50	0.43	0.32	0.24	1.00	0.5514
Weaned (30 days post-partum)	10.20 [a]	10.54 [a]	9.59 [b]	10.04 [ab]	1.14	0.0004
Litter weight (g) [2]						
At birth	605.70	619.34	580.93	643.98	142.6	0.1276
At 7 days post-partum	1306	1361	1272	1288	216.2	0.1646
At 14 days post-partum	2290	2398	2260	2276	318.1	0.1040
At 21 days p post-partum p	3314	3394	3227	3304	381.2	0.1613
At 30 days post-partum (weaning)	5782	5708	5447	5484	1129	0.3592
Milk production (kg) [3]	8.29	8.49	8.07	8.26	9.53	0.1613
Mortality in lactation (%) [4]	5.13 [ab]	2.83 [b]	3.43 [ab]	6.32 [a]	6.77	0.0325

[1] Number of does pregnant after pregnancy diagnosis at 11 days post AI/total does inseminated × 100. [2] This parameter was obtained from 50 litters per experimental group. [3] Milk production = 0.75 ± 1.75 × LW21 (kg) where LW21 corresponds to litter weight at 21 days of lactation. [4] Mortality: [100−(kits weaned/no. of kits after litter adjustment to 8–12 kits) × 100]. Data are shown as least squares means. RMSE: root mean square error. Values in the same row with different letters are significantly different. pp: post-partum.

Fertility, kits born alive and stillborn, and litter weight at birth and during lactation were similar between groups ($p > 0.05$). However, after litter adjustment, the effect of MFR on the number of weaned kits and mortality of kits during lactation was significantly different between groups ($p = 0.0004$ and $p = 0.0325$, respectively). Control and R07 does weaned more kits than R721 does, whereas R021 does had an intermediate result. The highest and lowest mortalities during lactation were observed in R021 and R07 litters, respectively.

At the end of the study, the percentage of culled does was 7.6, 4.2, 5.4 and 6.4% in Control, R07, R721 and R021 groups, respectively ($p > 0.05$).

3.4. Long-Term Maternal Metabolic and Hormonal Study

Endocrine and metabolic parameters obtained in the experimental groups during pregnancy are shown in Table 4.

Regarding thyroid hormones, the animals subjected to the most extended restriction treatment (R021) had lower plasma T3 concentrations than Control and R07 does ($p = 0.0196$) but similar to R721 ones. Plasma T3 concentrations decreased significantly on days 14 and 21 of pregnancy in relation to day 0 and returned to intermediate values on day 28 ($p = 0.0026$). Plasma T4 concentrations on Days 14 and 21 of pregnancy were also significantly lower than on day 28 ($p = 0.0001$) but similar to that on day 0. MFR did not affect T4 concentrations, T3 to T4 ratio, plasma glucose and HOMA-IR ($p > 0.05$).

Table 4. Effect of maternal feed restriction (MFR) and time on endocrine and metabolic parameters during pregnancy of rabbits fed ad libitum (Control), restricted to 60% one week from day 0 to 7 (R07), two weeks from day 7 to 21 (R721) and three weeks from day 0 to 21 (R021) of gestation.

	Maternal Feed Restriction				Days of Pregnancy					*p* Value		
Pregnancy	**Control n = 5**	**R07 n = 5**	**R721 n = 5**	**R021 n = 5**	**0 n = 10**	**14 n = 20**	**21 n = 20**	**28 n = 20**	**RMSE**	p_{MFR}	p_{Time}	$p_{MFR \times Time}$
T3 (pg/mL)	3.76 ^{a}	3.77 ^{a}	3.19 ^{ab}	3.06 ^{b}	4.16 ^{a}	3.07 ^{b}	3.02 ^{b}	3.54 ^{ab}	0.79	0.0196	0.0026	0.0353
T4 (pg/mL)	4.74	4.24	5.00	5.16	5.89 ^{ab}	3.66 ^{b}	2.58 ^{b}	7.00 ^{a}	3.11	0.8525	0.0001	0.5731
T3 to T4 ratio	1.45	1.05	1.01	1.12	0.91 ^{ab}	1.00 ^{a}	2.06 ^{a}	0.66 ^{b}	1.24	0.8079	0.0022	0.5237
Insulin (mU/L)	15.73 ^{a}	15.71 ^{a}	9.47 ^{b}	12.45 ^{ab}	16.26	10.10	12.80	14.20	6.57	0.0225	0.0871	0.0055
Glucose (mg/dL)	79.94	78.00	74.49	84.13	63.82 ^{b}	61.72 ^{b}	76.64 ^{b}	114.38 ^{a}	22.34	0.6207	0.0001	0.7501
Glucose-to-insulin ratio	6.79 ^{b}	7.12 ^{b}	12.93 ^{a}	9.17 ^{ab}	4.59	9.56	10.26	11.70	6.79	0.0482	0.0802	0.2518
HOMA-IR	2.90	3.11	1.75	2.87	2.63 ^{ab}	1.44 ^{b}	2.40 ^{b}	4.15 ^{a}	1.79	0.1140	0.0001	0.0049
NEFAS (mmol/L)	0.42 ^{ab}	0.33 ^{b}	0.62 ^{a}	0.52 ^{ab}	0.54	0.54	0.46	0.35	0.27	0.0158	0.0781	0.0100
Corticosterone (ng/mL)	257.45	274.56	256.02	251.15	293.30 ^{a}	363.82 ^{b}	192.20 ^{c}	195.85 ^{c}	12.13	0.7344	0.0001	0.2519

NEFAS: no esterified fatty acids. RMSE: root mean square error. HOMA-IR: homeostasis model assessment for insulin resistance [Insulin × (glucose/18)/22.5]. Values in the same row with different letters (a, b, c) are significantly different.

However, insulinemia was lower, and glucose-to-insulin ratio was higher in R721 does than in Control and R07 does, but similar to R021 ones ($p = 0.0225$ and $p = 0.0482$, respectively). In addition, plasmatic glucose increased dramatically at the end of pregnancy in all groups ($p < 0.0001$).

The highest and lowest NEFA concentrations were obtained in R721 and R07 does, respectively, and Control and R021 does showed intermediate values ($p = 0.0158$). No significant differences in NEFA levels throughout the pregnancy period were observed ($p > 0.05$).

Finally, plasma corticosterone concentration was only affected by time. The lowest concentrations of this stress indicator were observed at 21 and 28 days of pregnancy ($p < 0.0001$).

MFR and time had significant effects on plasma concentrations of T3 ($p = 0.0353$), insulin ($p = 0.0055$), NEFA ($p = 0.0100$) and HOMA index ($p = 0.0049$) (Figure 3A–D, respectively). On day 21 of pregnancy, R021 does showed a dramatic reduction in plasma concentrations of T3 compared to R07 groups, but it was similar to Control and R721 does. The lowest plasma insulin concentrations were observed on day 21 of pregnancy in the rabbit females restricted at this time (R721 and R021). Control and R07 does had the lowest NEFA concentrations on day 14 of pregnancy. During the first half of pregnancy, HOMA-IR remained lower than 3 and by day 21 of gestation its values rose above the limit established to consider insulin resistance in Control and R07 groups. On day 28 of pregnancy, all groups showed HOMA-IR values over 3 except for group R721.

As shown in Table 5, MFR did not affect any maternal endocrine or metabolic parameters in the experimental groups during lactation ($p > 0.05$). As the lactation period progressed, T3 and glucose concentrations remained at similar values during the first two weeks of lactation, but insulin and HOMA-IR decreased on day 14 ($p = 0.0006$) compared to day 7. On weaning day, non-pregnant does had lower T3 concentrations than pregnant ones ($p < 0.0056$), but HOMA-IR, glucose and insulin concentrations were similar in both ($p > 0.05$).

Energy mobilization measured by means of plasma NEFA concentrations was similar in all groups and during all lactation. Plasma corticosterone concentrations as welfare indicators were not affected by MFR. However, significant increases in this hormone were observed as lactation progressed. No significant interactions between MFR and time in any of the studied variables were detected in this period.

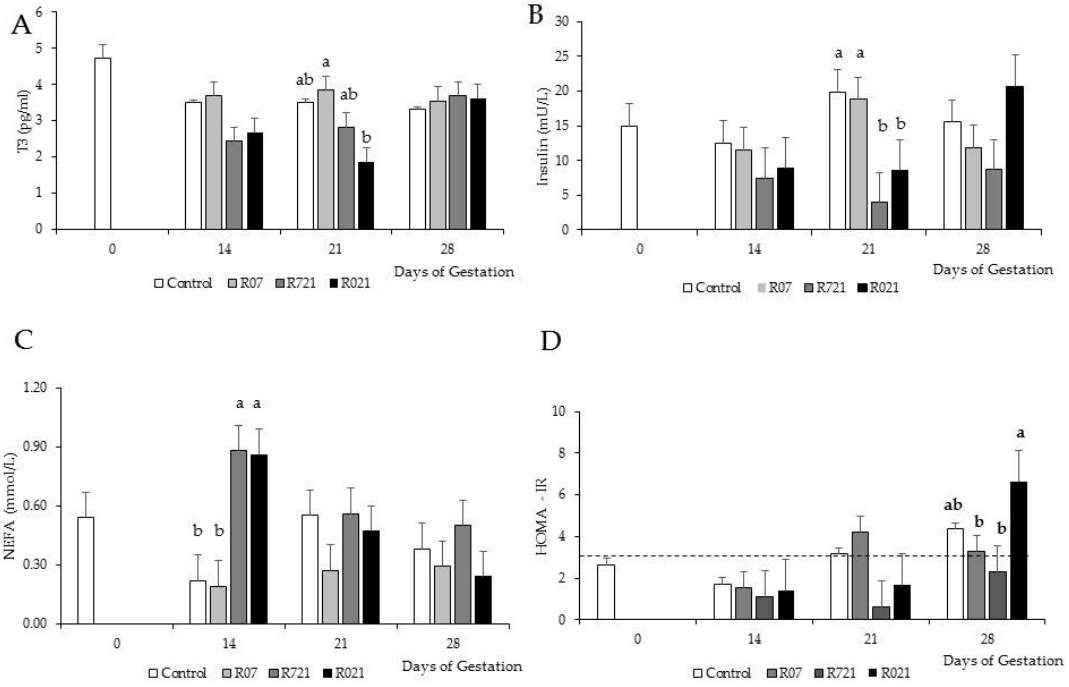


Figure 3. Effect of Maternal Feed Restriction and Time on (**A**) plasma triiodothyronine (T3), (**B**) insulin, (**C**) NEFA concentrations and (**D**) HOMA-IR during pregnancy of rabbits fed ad libitum (Control), restricted to 60% one week from day 0 to 7 (R07), two weeks from day 7 to 21 (R721) and three weeks from day 0 to 21 (R021) of gestation. (a–c): different letters indicate differences between experimental groups on each day of pregnancy ($p < 0.05$). Each bar on day 14, 21 and 28 shows the mean of five does, and on day 0 is the mean of 10 does. The dashed line in (D) represents the value above which HOMA-IR indicates the presence of insulin resistance.

Table 5. Effect of Maternal Feed Restriction (MFR) and Time on endocrine and metabolic parameters during lactation of rabbits fed ad libitum (Control), restricted to 60% one week from day 0 to 7 (R07), two weeks from day 7 to 21 (R721) and three weeks from day 0 to 21 (R021) of gestation.

	Maternal Feed Restriction				Days of Lactation					*p* Value		
Lactation	**Control**	**R07**	**R721**	**R021**	**7**	**14** [1]	**30** [2]					
	n = 5	**n = 5**	**n = 5**	**n = 5**	**n = 20**	**n = 20**	**(P) n = 20**	**(NP) n = 20**	**RMSE**	p_{MFR}	p_{Time}	$p_{MFR \times Time}$
T3 (pg/mL)	3.47	3.41	3.48	3.40	3.70 ^{a}	3.56 ^{a}	3.54 ^{a}	2.95 ^{b}	0.66	0.9830	0.0056	0.0878
T4 (pg/mL)	10.10	12.83	11.26	11.38	7.84	12.45	13.18	12.10	5.76	0.6012	0.0753	0.5611
T3 to T4 ratio	0.57	0.36	0.40	0.72	0.74	0.67	0.33	0.31	0.58	0.2853	0.0847	0.2714
Insulin (mU/L)	16.36	12.09	13.36	14.23	21.48 ^{a}	12.83 ^{b}	10.05 ^{b}	11.68 ^{b}	7.41	0.4223	0.0006	0.2539
Glucose (mg/dL)	114.33	109.93	109.31	109.51	116.51 ^{a}	111.28 ^{ab}	112.09 ^{ab}	103.20 ^{b}	12.40	0.6352	0.0199	0.2822
Glucose to Insulin ratio	10.31	21.19	11.05	17.95	6.73 ^{b}	15.13 ^{b}	23.34 ^{a}	15.30 ^{b}	15.83	0.1555	0.0469	0.0802
HOMA IR	4.73	3.32	3.70	3.95	6.26 ^{a}	3.58 ^{b}	2.82 ^{b}	3.05 ^{b}	2.17	0.3178	0.0003	0.2801
NEFAS (mmol/L)	0.26	0.28	0.25	0.29	0.24	0.26	0.27	0.30	0.12	0.8113	0.4605	0.2305
Corticosterone (ng/mL)	239.11	234.36	215.89	246.54	151.11 ^{a}	217.52 ^{b}	272.84 ^{c}	294.44 ^{c}	11.51	0.4158	0.0001	0.2334

HOMA-IR: homeostasis model assessment for insulin resistance. NEFA: no esterified fatty acids. [1] 3rd artificial insemination was carried out on day 14 of lactation. [2] Weaning day. P: pregnant. NP: non-pregnant. RMSE: root mean square error. Values in the same row with different letters are significantly different.

4. Discussion

This work deals with the potential consequences of moderate MFR in different periods (1, 2 or 3 weeks) throughout gestation on reproductive outcome, including fetoplacental development and post-natal growth and survival of litters from primiparous rabbit does, and introduces further insight involving endocrine and metabolic parameters during pregnancy and the following lactation.

After different MFR periods, when fed ad libitum, all pregnant does significantly increased their feed intake. These results match with those observed in our previous studies [9,14,15]. Dams from R721 and R021 groups altogether consumed 1.3 kg and 1.8 kg

less feed than the Control group during gestation, respectively. Those in the R07 group reduced their feed intake by about 300 g compared to the Control group. Considering the feed intake of Control females during the second and third weeks as the average regular consumption (227 ± 6.0 g/d and 228.3 ± 6.1 g/d), R721 and R021 does ingested 46% of the food that the Controls did. Consequently, LBW of these does was impaired, showing around a 5.2% decrease in LBW compared to Control or R07.

As expected, the number of corpora lutea assessed in the rabbits on day 28 of gestation was similar in all groups, as MFR was applied right after AI, with no impact on the ovulation rate. Similar results have been described in our previous studies where only Control and R021 treatments were compared [14,15]. Nonetheless, R07 does tended to have a higher number of fetuses, although with worse viability. In rabbits, the implantation and placentation events occur after day 6–7 post-AI [24]. In the current study, at that time R07 females experienced a significant compensatory increase in feed intake, surpassing the Control group. The slight increase in implanted fetuses observed in this group could lead to greater competition between them for uterine space and nutrients, ultimately leading to lower viability [25].

The dimensions of the fetuses were affected by the restriction, so that the longer it was, the more weight and length of the fetuses decreased, although the TD and the OND did not seem to have the same response. MFR usually causes vital organs, such as the brain or the liver, to increase their relative weight to the detriment of other organs [9,26]. This trend was not observed in this study, and other organs such as the kidneys and the liver reduced their weight in the fetuses of more restricted females. Several studies [12,27,28] assert that the longer and greater the feed deprivation is, the greater the probability of finding impaired fetal growth and development. Cappon et al. [29] performed an experiment evaluating MFR levels from slight to severe (110 g/d down to 15 g/d) and from days 7 to 19 of gestation (a period that registers from implantation to closure of the hard palate), recording the effect on fetal development. These authors showed that in severe feed deprivation, the size and weight of the fetuses were reduced, and the incidence of abortions and inadequate ossification increased. These results are in accordance with other studies [27,30] that evaluated the incidence of abortions and impairment of fetal development/growth due to feed restriction, where authors agreed that the main factors to be considered are the degree of intake restriction, its length, and more critically the period of gestation when it is applied [20], highlighting the second half of gestation as that where the energy intake of the mothers is most critical. The findings regarding fetal development comparing organ sizes of the fetuses between experimental groups at day 28 of gestation, suggest that the ration setting and periods of feed restriction applied have no long-term effects over the fetuses and later litter performance. In fact, in these experimental conditions, the brain/liver ratio was the same in all groups, and no critical variations in the relative weights of the fetal organs were observed due to the feed restriction, which supports the idea that the feed restriction applied is to be considered moderate compared to the existing records and does not induce severe impairment in fetal growth nor organogenesis.

In addition, MFR for 1, 2 or 3 weeks affected the growth of the placental structures. The largest placentas were those of R07 does, but this group was one of the least efficient, meaning that even though fetal growth directly depends on the placenta [31], in this group placentas were bigger than their fetuses. However, R721 does showed the smallest placenta because the mothers were restricted in the period when this tissue is developed. These results suggest that although placental efficiency was low in R07 and high in R721, the amount of energy provided during the period when does were fed ad libitum was enough to maintain gestation adequately, since does of these two groups were able to achieve a similar litter size at parturition, a high number of weaned kits (after adjustment), and the lowest lactation mortality rates. In this sense, Rommers et al. [28] described that a moderate decrease in energy intake during the first week of gestation, provided it is above maintenance needs, does not affect implantation rate, while in the fourth week of pregnancy, energy deprivation can generate more problems in the long-term.

Furthermore, during lactation and in the juvenile stage, our previous studies [14,15] that focused on the likely consequences on progeny of a three-week MFR (equal to the current R021 group) evidenced that the surviving offspring did not manifest any outstanding alterations in growth, serum or metabolic parameters nor feed intake during juvenile phase until puberty.

Regarding the effects of MFR on fertility and prolificacy of does, there were no adverse consequences. Although litter weight and milk production were similar between groups during lactation, a significant increase in kit mortality was observed in both the Control and R021 groups. It may be that litter adjustment performed after birth affected these results, but it is difficult to explain. Interestingly, does in group R07, despite previous lower fetal viability detected during pregnancy, had a better weaning outcome and lower kit mortality, outpacing the results of the other groups.

Concerning the mortality rate of the dams during the study (culled due to experimental needs or for other reasons such as low prolificacy, abortions, sudden deaths or mastitis), the data collected did not show significant differences between groups. They were consistent with the experimental farm's historical data, so these casualties can be considered incidental rather than related to the experimental conditions.

As to the effects of MFR on energy metabolism, thyroid hormones were determined to evaluate metabolic adaptation to energy intake deprivation. In the current study, the mothers that underwent a longer MFR presented lower T3 plasma concentrations. During the first three weeks of gestation, a decrease in T3 and T4 was also noted, along with an increase at the end when the females were fed ad libitum. The significant treatment $\times$ time interaction observed in T3 concentrations was due to the R021 group having the lowest T3 values on day 21 of pregnancy (after three continuous weeks of moderate restriction), but by the end of gestation all groups had similar concentrations. The decrease in free T3 during periods of feed restriction usually reduces the basal metabolic rate, resulting in energy savings for the animal [32], but of all metabolism-involved hormones, T3 is the fastest to recover [33]. Thus, in the 4th week of pregnancy and during lactation, when all groups were already fed ad libitum, energy homeostasis was balanced even in the case of T3. T4 plasma concentrations during lactation rose significantly more than those observed during gestation, indicating a total recovery of the energy metabolism after MFR.

The studied relation between insulin and glucose profiles suggests that females in the first half of pregnancy, being subjected to MFR, manage the diet's energy and body reserves. Insulin is an intermediate metabolic hormone, involved in many metabolic pathways to maintain energy homeostasis by coordinating the different axes and systems [34,35]. Furthermore, it should not be forgotten that insulin undergoes postprandial alterations and at day 14 of pregnancy the Control and R07 groups are both being fed ad libitum since day 0 and 7 of pregnancy, respectively. Afterwards, on day 21 of pregnancy, insulin increases and insulin resistance manifests with the rise in HOMA-IR in these groups, which Menchetti et al. [32] described as an adaptation to the energy demand produced by the fetuses. Following the same dynamic, decreased insulin plasma concentrations on day 21 of pregnancy in groups R721 and R021 reinforces the role of insulin in the gear of metabolism, since Buczkowska and Jarosz-Chobot [36] reported, in the same way as other authors [35], that reduced insulin plasma concentrations promotes lipolysis, which makes sense since by day 21 of pregnancy these dams had been restricted for two and three weeks, respectively, and needed to obtain energy from their body reserves. On the other hand, Fortun-Lamothe [37] described that the fetuses request high amounts of glucose at the end of gestation. Therefore, as MFR was over in R721 and R021 groups by the 4th week of gestation, these dams were obtaining glucose directly from the diet and their voluntary feed intake was considerably increased to compensate for the time of restriction, which would explain the glucose rise detected at this point, particularly in group R021, which underwent the longer MFR.

Moreover, HOMA-IR results showed significant differences between groups by the end of gestation (day 28). Particularly, R021 does displayed a critical rise in HOMA-IR

values, while other groups still did not exceed the limit to be considered insulin resistant (R07 and R721). This could be due to the continuous consumption of glucose by the fetuses that forces an increase in the mother's hepatic production of glucose by the liver during fasting to maintain plasmatic glucose sufficient to meet the needs of glucose-dependent tissues [38], which would also explain the slight but not significant rise of glucose in group R021 on day 28. Since circulating NEFA concentrations are not high enough in group R021 at this point to consider body reserve mobilization, it can be assumed that the main source of glucose was energy obtained from the diet, which at this time was being provided ad libitum for all groups.

In humans and other species, the second half of pregnancy is defined by a progressive increase in resistance to the action of insulin, so that in the third-trimester insulin sensitivity is about a third of normal and insulin levels are increased by about four times [39,40], which in our study would be equivalent to the 3rd and 4th weeks of gestation. Other authors have also obtained these same results and appreciations in rabbits [41], which concur with the data obtained in this study.

As shown by the data, MFR during gestation affected the overall energetic balance of the does and high NEFA plasma concentrations are a manifestation of body reserves mobilization. In this study, MFR affected plasma NEFA concentrations, and the highest values were observed on day 14 in the mothers with a more prolonged period of restriction at this time. This is in accordance with other studies where authors determined higher NEFA plasma concentrations in does undergoing slight to moderate MFR during similar gestation periods [32,42]. Additionally, lower circulating NEFA concentrations were observed on day 14 of gestation in Control and R07 groups, which supports the previous statement and suggests a redirection of metabolism towards a reduction of lipolysis due to higher energy intake in these groups.

Conductive to the lactation period, the main difference between groups occurred with T3 concentrations in pregnant and non-pregnant females, with lower levels in the latter. Since the third AI was performed on day 14 after parturition, increased T3 in lactating-pregnant dams may be explained by its role in tissue synthesis, particularly in the first half of pregnancy [43]. Moreover, Bober et al. [44] reported that thyroid hormones are considered necessary for cellular metabolism of the mammary gland and energy utilization, which may be an important factor in fetal development during pregnancy and milk biosynthesis, which is relevant for our study since pregnant does are overlapping lactation and 3rd pregnancy. Highlighting the slight insulin and HOMA-IR decrease that occurred on day 14 compared to day 7 post-partum, this could be explained by the stressful event of AI, which implies manipulation of the animals (removing the females from their cages, holding them by the tail, inserting the insemination catheter and injecting GnRH). When stressful situations occur, insulin levels fall, glucagon and epinephrine (adrenaline) levels rise and more glucose is released from the liver [45].

Surprisingly, no differences due to MFR between experimental groups were observed during pregnancy and lactation, something unexpected since corticosterone was assessed as a hormonal measure of stress in the animals. Some authors contend that plasma corticosterone concentrations correspond more with metabolic stress than with behavioral stress [33], which would support the assertion that in this study, MFR is only moderate and implies no metabolic depletion of the dams, since corticosterone was lower by the end of gestation. On the other hand, Menchetti et al. [32] measured cortisol levels during the pregnancies of does subjected to MFR and determined that this parameter was not altered during gestation, which can be attributed to changes in the body's regulation during pregnancy that favor the maintenance of glucocorticoid levels, which is essential for the correct maturation of many fetal organs [46–49].

However, it is interesting to note that at the end of lactation, corticosterone levels are higher than those on day 7 of lactation. This could be explained due to the size of the kits towards the end of lactation. Kits begin to leave the nest at 14–16 days of age [50], and other authors have described that higher housing density could increase corticosterone

circulating levels [51]. In these experimental conditions, by the end of lactation there are approximately 10 kits per doe weighing around 500 g, which leave the nest and occupy a lot of space in the cage, try to continue suckling and can increase the mother's level of discomfort and explain the rise in corticosterone. Nonetheless, further studies are needed to corroborate this hypothesis.

5. Conclusions

The present study states that a moderate MFR (60% of the estimated voluntary feed intake) applied during 1, 2 or 3 weeks of gestation followed by ad libitum refeeding confirms previous results regarding compensatory food intake by mothers, which helps to preserve maternal energy homeostasis (thyroid hormones, glucose and insulin) and lipid metabolism (NEFA). This allowed the necessary energy supply to be delivered to the fetuses to conduct fetal growth and development satisfactorily, confirming previously obtained results as no major long-term effects in the early life development of the offspring were observed. Moreover, the compensatory feed intake granted the maintenance of an adequate productive performance in the current pregnancy and showed no effect whatsoever in the amount of milk produced, the viability of litters or the mortality rate of the dams. In addition, the corticosterone concentrations observed throughout pregnancy and lactation seem to indicate that, in our experimental conditions, the moderate MFR applied seems not to induce additional stress in dams along the gestation and lactation periods studied. Moreover, it has proven that this strategy can be profitable for the farmer as overall feed intake was lower in all experimental groups compared to the Control group. In summary, these results reveal that as long as the feed supply covers maintenance needs, moderate MFR is a suitable strategy to reduce production costs, since it implies no adverse effects on the metabolic, energetic and welfare status of the dams, and on pre- and post-natal growth of fetuses and litters, respectively.

Author Contributions: Conceptualization, P.L.L., M.A.-Á., R.M.G.-G. and P.G.R.; data curation, M.R. and P.G.R.; formal analysis, C.F.-P., P.M., M.R. and P.G.R.; funding acquisition, P.L.L., M.A.-Á., R.M.G.-G. and P.G.R.; investigation, C.F.-P., P.M., M.R., N.F.-R., A.S.-R., M.A.-Á., R.M.G.-G. and P.G.R.; writing—original draft, C.F.-P., P.M. and P.G.R.; writing—review and editing, C.F.-P., P.M., M.R., N.F.-R., A.S.-R., P.L.L., M.A.-Á., R.M.G.-G. and P.G.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the SPANISH MINISTRY OF ECONOMY AND COMPETITIVENESS (Grant Number: AGL2015-65572 and RTI2018-094404-B).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of The Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the TECHNICAL UNIVERSITY OF MADRID (protocol code PROEX 302/15 approved in 2015).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We thank B. Velasco for her assistance with the animal husbandry and maintenance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cartuche, L.; Pascual, M.; Gómez, E.A.; Blasco, A. Economic weights in rabbit meat production. *World Rabbit. Sci.* **2014**, *22*, 165–177. [CrossRef]
2. Theau-Clément, M. Preparation of the rabbit doe to insemination: A review. *World Rabbit. Sci.* **2010**, *15*, 61–80. [CrossRef]
3. Fortun-Lamothe, L.; Rochambeau, H.; Lebas, F.; Tudela, F. Influence of the number of suckling young on reproductive performance in intensively rabbit does. In Proceedings of the 7th World Rabbit Congress, Valencia, Spain, 4–7 July 2000; pp. 125–132.
4. Arias-Álvarez, M.; García-García, M.R.; Rebollar, P.G.; Revuelta, L.; Millán, P.; Lorenzo, P.L. Influence of metabolic status on oocyte quality and follicular characteristics at different post-partum periods in primiparous rabbit does. *Theriogenology* **2009**, *72*, 612–623. [CrossRef] [PubMed]
5. Sakr, O.G.; García-García, R.M.; Arias-Álvarez, M.; Lorenzo, P.L.; Millán, P.; Velasco, B.; Rebollar, P.G. Métodos de sincronización de celo en conejas primiparas lactantes a 25 días post-parto. *Rev. Complut. Cienc. Vet.* **2012**, *6*, 6–13.

6. Partridge, G.G.; Lobley, G.E.; Fordyce, R.A. Energy and nitrogen metabolism of rabbits during pregnancy, lactation, and concurrent pregnancy and lactation. *Br. J. Nutr.* **1986**, *56*, 199–207. [CrossRef]
7. Bauman, D.E.; Currie, W.B. Partitioning of Nutrients During Pregnancy and Lactation: A Review of Mechanisms Involving Homeostasis and Homeorhesis. *J. Dairy Sci.* **1980**, *63*, 1514–1529. [CrossRef]
8. Rommers, J.M.; Kemp, B.; Meijerhof, R.; Noordhuizen, J.P.T.M. The effect of litter size before weaning on subsequent body development, feed intake, and reproductive performance of young rabbit does. *J. Anim. Sci.* **2001**, *79*, 1973–1982. [CrossRef] [PubMed]
9. Lopez-Tello, J.; Arias-Álvarez, M.; Jimenez-Martinez, M.A.; Garcia-Garcia, R.M.; Rodriguez, M.; Gonzalez, P.L.L.; Bermejo-Poza, R.; Gonzalez-Bulnes, A.; Rebollar, P.G. Competition for Materno-Fetal Resource Partitioning in a Rabbit Model of Undernourished Pregnancy. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0169194. [CrossRef]
10. Partridge, G.G.; Daniels, Y.; Fordyce, R.A. The effects of energy intake during pregnancy in doe rabbits on pup birth weight, milk output and maternal body composition change in the ensuing lactation. *J. Agric. Sci.* **1986**, *107*, 697–708. [CrossRef]
11. López-Tello, J.; Arias-Álvarez, M.; Jiménez-Martínez, M.A.; Barbero-fernábdez, A.; García, R.M.; Rodríguez, M.; Lorenzo, P.L.; Torres-Rovira, L.; Astiz, S.; González-Bulnes, A.; et al. The effects of sildenafil citrate and haemodynamics in a rabbit model of intaruterine growth restriction. *Reprod. Fertil. Dev.* **2016**, *29*, 1239–1248.
12. Nafeaa, A.; Ahmed, S.A.E.; Fat Hallah, S. Effect of feed restriction during pregnancy on performance and productivity of New Zealand white rabbit does. *Vet. Med. Int.* **2011**, *2011*, 839737. [CrossRef]
13. Manal, A.F.; Tony, M.A.; Ezzo, O.H. Feed restriction of pregnant nulliparous rabbit does: Consequences on reproductive per-formance and maternal behaviour. *Anim. Reprod. Sci.* **2010**, *120*, 179–186. [CrossRef]
14. Garcia-Garcia, R.; Arias-Alvarez, M.; Millan, P.; Francisco, M.R.; Rodriguez, A.S.; Lorenzo, P.; Rebollar, P. Gestation Food Restriction and Refeeding Compensate Maternal Energy Status and Alleviate Metabolic Consequences in Juvenile Offspring in a Rabbit Model. *Nutrition* **2021**, *13*, 310. [CrossRef]
15. García-García, R.M.; Arias-Álvarez, M.; Rodríguez, M.; Sánchez-Rodríguez, A.; Formoso-Rafferty, N.; Lorenzo, P.L.; Rebollar, P.G. Effects of feed restriction during pregnancy on maternal reproductive outcome, foetal hepatic IGF gene expression and offspring performance in the rabbit. *Animal* **2021**, in press.
16. Mullur, R.; Liu, Y.-Y.; Brent, G.A. Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 355–382. [CrossRef] [PubMed]
17. Nakrani, M.N.; Wineland, R.H.; Anjum, F. Physiology, Glucose Metabolism. In *StatPearls*; StatPearls [Internet]; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2021.
18. Aronoff, S.L.; Berkowitz, K.; Shreiner, B.; Want, L. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectr.* **2004**, *17*, 183–190. [CrossRef]
19. Emery, R.S.; Liesman, J.S.; Herdt, T.H. Metabolism of Long Chain Fatty Acids by Ruminant Liver. *J. Nutr.* **1992**, *122*, 832–837. [CrossRef]
20. Brecchia, G.; Menchetti, L.; Cardinali, R.; Polisca, A.; Troisi, A.; Maranesi, M.; Boiti, C. Effects of fasting during pregnancy in rabbit does. In Proceedings of the 10th World Rabbit Congress, Sharm El-Sheikh, Egypt, 3–6 September 2012; pp. 341–345.
21. Webster, J. Animal Welfare: Freedoms, Dominions and "A Life Worth Living". *Animals* **2016**, *6*, 35. [CrossRef]
22. Woodman, D. *Reproductive Hormones In: Laboratory Animal Endocrinology*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 1997; pp. 453–499.
23. Helfenstein, T.; Fonseca, F.A.; Ihara, S.S.; Bottós, J.M.; Moreira, F.T.; Pott, H., Jr.; Farah, M.E.; Martins, M.C.; Izar, M.C. Impaired glucose tolerance plus hyperlip-idaemia induced by diet promotes retina microaneurysms in New Zealand rabbits. *Int. J. Exp. Pathol.* **2011**, *92*, 40–49. [CrossRef] [PubMed]
24. Enders, A.C.; Schlafke, S. Penetration of the uterine epithelium during implantation in the rabbit. *Am. J. Anat.* **1971**, *132*, 219–239. [CrossRef] [PubMed]
25. Argente, M.J.; Santacreu, M.; Climent, A.; Blasco, A. Effects of intrauterine crowding on available uterine space per fetus in rabbits. *Livest. Sci.* **2008**, *114*, 211–219. [CrossRef]
26. Godfrey, K.M.; Barker, D.J.; Aranceta, J.; Serra-Majem, L.; Ribas, L.; Pérez-Rodrigo, C. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr.* **2001**, *4*, 611–624. [CrossRef] [PubMed]
27. Matsuoka, T.; Mizoguchi, Y.; Serizawa, K.; Ishikura, T.; Mizuguchi, H.; Asano, Y. Effects of Stage and Degree of Restricted Feeding on Pregnancy Outcome in Rabbits. *J. Toxicol. Sci.* **2006**, *31*, 169–175. [CrossRef]
28. Rommers, J.M.; Meijerhof, R.; Noordhuizen, J.P.T.M.; Kemp, B. The effect of level of feeding in early gestation on reproductive success in young rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.* **2004**, *81*, 151–158. [CrossRef] [PubMed]
29. Cappon, G.; Fleeman, T.; Chapin, R.; Hurtt, M. Effects of feed restriction during organogenesis on embryo-fetal development in rabbit. *Birth Defects Res. Part B Dev. Reprod. Toxicol.* **2005**, *74*, 424–430. [CrossRef]
30. Clark, R.L.; Robertson, R.T.; Peter, C.P.; Bland, J.A.; Nolan, T.E.; Oppenheimer, L.; Bokelman, D.L. Association between adverse maternal and embryo-fetal effects in norfloxacin-treated and food-deprived rabbits. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1986**, *7*, 272–286. [CrossRef]
31. Robinson, J.S.; Owens, J.A.; Owens, P.C. *Fetal Growth and Growth Retardation. Textbook of Fetal Physiology*; Thorburn, G.D., Harding, R., Eds.; Oxford University Press: New York, NY, USA, 1994; pp. 83–94.

32. Menchetti, L.; Brecchia, G.; Canali, C.; Cardinali, R.; Polisca, A.; Zerani, M.; Boiti, C. Food restriction during pregnancy in rabbits: Effects on hormones and metabolites involved in energy homeostasis and metabolic programming. *Res. Vet.-Sci.* **2015**, *98*, 7–12. [CrossRef] [PubMed]
33. Brecchia, G.; Bonanno, A.; Galeati, G.; Federici, C.; Maranesi, M.; Gobbetti, A.; Zerani, M.; Boiti, C. Hormonal and metabolic adaptation to fasting: Effects on the hypothalamic–pituitary–ovarian axis and reproductive performance of rabbit does. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2006**, *31*, 105–122. [CrossRef]
34. Hornick, J.; Van Eenaeme, C.; Gérard, O.; Dufrasne, I.; Istasse, L. Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2000**, *19*, 121–132. [CrossRef]
35. Rommers, J.M.; Boiti, C.; Brecchia, G.; Meijerhof, R.; Noordhuizen, J.P.T.M.; Decuypere, E.; Kemp, B. Metabolic adaptation and hormonal regulation in young rabbit does during long-term caloric restriction and subsequent compensatory growth. *Anim. Sci.* **2004**, *79*, 255–264. [CrossRef]
36. Buczkowska, E.O.; Jarosz-Chobot, P. Insulin effect on metabolism in skeletal muscles and the role of muscles in regulation of glucose homeostasis. *Przegl. Lek.* **2001**, *58*, 782–787.
37. Fortun-Lamothe, L. Energy balance and reproductive performance in rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.* **2006**, *93*, 1–15. [CrossRef]
38. Garcia-Benasach, F. Diabetes Gestacional Análisis de la Influencia de Parámetros Clínicos y Ecográficos en los Resultados pe-rinatales. Ph.D. Thesis, Autonomic University of Madrid, Madrid, Spain, 2012.
39. Buchanan, T.A.; Metzger, B.E.; Freinkel, N.; Bergman, R.N. Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1990**, *162*, 1008–1014. [CrossRef]
40. Père, M.-C.; Etienne, M. Insulin sensitivity during pregnancy, lactation, and post-weaning in primiparous gilts1. *J. Anim. Sci.* **2007**, *85*, 101–110. [CrossRef] [PubMed]
41. Menchetti, L.; Andoni, E.; Barbato, O.; Canali, C.; Quattrone, A.; Vigo, D.; Codini, M.; Curone, G.; Brecchia, G. Energy homeostasis in rabbit does during pregnancy and pseudopregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* **2020**, *218*, 106505. [CrossRef]
42. Martínez-Paredes, E.; Ródenas, L.; Martínez-Vallespín, B.; Cervera, C.; Blas, E.; Brecchia, G.; Boiti, C.; Pascual, J.J. Effects of feeding programme on the performance and energy balance of nulliparous rabbit does. *Animals* **2012**, *6*, 1086–1095. [CrossRef] [PubMed]
43. Habeeb, A.A.; EI-Masry, K.A. Hormonal pattern in pregnant rabbits and some productive aspects as affected by litter size at birth. 1991. *Egypt J. Poult. Sci.* **1991**, *1*, 429.
44. Bober, M.A.; Dollah, A.; Becker, B.A.; Johnson, H.D. The influence of exogenous T3 on plasma prolactin, T3, TSH and milk production during heat stress in Holstein cows. *J. Anim. Sci.* **1980**, *55*, 339.
45. Ganong, W.F. The Stress Response—A Dynamic Overview. *Hosp. Pract.* **1988**, *23*, 155–171. [CrossRef]
46. Brunton, P.J.; Russell, J.A.; Douglas, A.J. Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. *J. Neuroendocrinol.* **2008**, *20*, 764–776. [CrossRef]
47. Entringer, S.; Buss, C.; Shirtcliff, E.A.; Cammack, A.; Yim, I.S.; Chicz-DeMet, A.; Sandman, C.A.; Wadhwa, P.D. Attenuation of maternal psychophysiological stress responses and the maternal cortisol awakening response over the course of human pregnancy. *Stress* **2009**, *13*, 258–268. [CrossRef] [PubMed]
48. Tamashiro, K.L.; Moran, T.H. Perinatal environment and its influences on metabolic programming of offspring. *Physiol. Behav.* **2010**, *100*, 560–566. [CrossRef]
49. Mastorakos, G.; Ilias, I. Maternal and Fetal Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axes During Pregnancy and Postpartum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003**, *997*, 136–149. [CrossRef] [PubMed]
50. Szendrő, Z.; Trocino, A.; Hoy, S.; Xiccato, G.; Villagrá, A.; Maertens, L. A review of recent research outcomes on the housing of farmed domestic rabbits: Reproducing does. *World Rabbit. Sci.* **2019**, *27*, 1–14. [CrossRef]
51. Kalaba, Z.M. Physiological Response and Stress Indicators of California Rabbits under Intensive Conditions in Egypt. *Asian J. Poult. Sci.* **2012**, *6*, 65–78. [CrossRef]