

Máster Interuniversitario en Mejora Genética Animal
y Biotecnología de la Reproducción

**Efecto del tipo genético materno
sobre el embrión, la supervivencia
fetal y las características de
crecimiento en conejos**

Tesis de Máster

Valencia, junio de 2016

Jesús Valdés Hernández

Director:

Dr. Francisco Marco Jiménez

AGRADECIMIENTOS

Reconocer el orden de agradecimientos durante todo el proceso de realización del máster puede ser extenso, ya que en el mismo intervienen numerosas personas e instituciones que hacen posible y proporcionan la oportunidad de formación; aun así, no quiero dejar pasar por alto hasta la más mínima colaboración que me permitió formarme.

Por ello de forma general agradezco:

Al IAMZ-CIHEAM por concederme la beca para realizar el máster (sin ello no hubiese sido posible la realización del mismo), en especial al Dr. Armando OCCON PLAZAHOLA; así como a las instituciones organizadoras (UPV y UAB).

A todos los profesores del máster que aportaron sus conocimientos y experiencia para una correcta formación.

También a los centros e institutos colaboradores (CRAG, IRATA, CITA e IVIA) por permitir las visitas y prácticas en sus instalaciones.

De forma particular:

A Mi esposa Judith Carmen Miranda Alejo, por su amor y tener esa admirable paciencia; dedicando tanto tiempo en la búsqueda de becas para que continuara mi formación.

Al secretario del máster Ing. Ion Pérez Baena por su eficiencia en la gestión de mis documentos para la obtención del visado y demás trámites administrativos.

A los profesores: Armad Sánchez, Marcel Amills, Josep M. Folch Miguel, Pérez Enciso, Alex Clop, Ana Puig y Sebastián Ramos (todos ellos me brindaron sus conocimientos y su sabiduría durante el primer trimestre en la UAB).

Al profesor Agustín Blasco Matéu por: tenerme paciencia, enseñarme y llamarme la atención para con los estudios en su debido momento.

A la Dra. María Antonia Santa Creu y al profesor Manuel Baselga; gracias a ambos por motivarme, por sus exigencias, paciencia y enseñarme con dedicación.

Al estimado Dr. José Salvador Vicente Antón por contribuir acertadamente en la realización de la parte experimental de la tesina, y por enseñarme con paciencia el "ABC" de las biotecnologías de la reproducción.

A mi estimado tutor Dr. Francisco Marco Jiménez por aceptarme, y desde un principio brindarme su apoyo incondicional, darme todas las libertades posibles para formarme, brindarme su tiempo y conocimientos para realizar esta investigación.

A todo el grupo de Biotecnología de la Reproducción, por su colaboración para realizar esta tesina: Dra. Estrella Jiménez Trigos, MsC. Carmen Naturil Alfonso, MsC. Ximo García Domínguez y Tec. Luís García Valero.

A las investigadoras del CITA- IVIA: Dra. Maria Pilar Viudes-de-Castro, Dra. Eva Mocé Cervera por impartirme docencia y recibirme en su centro.

A todos los investigadores y especialistas que nos visitaron y nos dieron videoconferencias online, compartiendo sus experiencias y proporcionándonos documentos de apoyo a la docencia.

A los compañeros del máster por ayudarme cuando se los pedía, les nombro a: José Isaí Cedano, Bolívar Samuel Sosa, María Velasco Galilea y María Patricia Martínez.

Finalmente, y no por ser menos importante, quiero agradecer especialmente a toda mi familia cubana y boliviana, que siempre me apoyan espiritualmente. Ambas son mi fuente de motivación para salir hacia adelante, esforzarme cada día más y poder hacer frente a la realidad que nos toca.

A los que en paz descansen “mis padres”: Jesús Valdés Berra (Boruco) y María Magdalena Hernández (Magdi), gracias a ellos tengo este ser y sé que a pesar de ya no están, siempre me acompañan con su imagen ejemplarizante.

A mis queridos abuelos por parte de madre: “papi Pedro” y “mima María”, ustedes me vieron crecer y cuidaron de mí hasta mi adolescencia.

A mí admirado hermano Jasiel Valdés Hernández por acompañarme en los momentos más difíciles, y por asumir la responsabilidad como si hubiese sido él “El hermano mayor”.

A mis suegros bolivianos: Sr. Benedicto Miranda y Sra. Sonia Alejo por aceptarme en su familia, brindándome todo su apoyo en los momentos más necesitados, así como a sus demás hijos.

RESUMEN

Actualmente, la influencia del genotipo materno y embrionario sobre la supervivencia prenatal sigue siendo poco clara. Sin embargo, se sabe que el genotipo de la madre determina parcialmente el ambiente uterino, lo que puede conllevar a inducir efectos en el desarrollo del feto tanto a nivel prenatal como postnatal. Mientras que varios estudios han relacionado la supervivencia prenatal con el genotipo materno, otros sugieren que el genotipo embrionario podría modificar las secreciones uterinas, por lo que la supervivencia prenatal ya no depende exclusivamente de factores maternos. Específicamente, en el conejo ha sido demostrado que tanto el genotipo embrionario como el materno pueden afectar la supervivencia de los embriones. El presente estudio, tuvo como objetivo evaluar en cada etapa del desarrollo prenatal y postnatal, el efecto de diferentes ambientes maternos en la supervivencia y las características de crecimiento. El efecto materno fue determinado por comparación entre tres diferentes genotipos, dos de ellos seleccionados por caracteres reproductivos, pero con diferentes métodos de selección genética (genotipo A y V), y el tercero un genotipo seleccionado por ganancia media diaria durante el engorde. Para descartar el efecto del genotipo embrionario, todos los embriones procedían del genotipo R. Además, todo el experimento se focalizó en el efecto materno al jerarquizar las receptoras al embrión. Para ello, las donantes (n=39) fueron superovuladas con una inyección subcutánea de corifolitropina alfa (0.75 µg/kg, Elonva®). Sesenta horas después, fueron inseminadas (IA) e inducidas a ovular, recuperándose los embriones 72 h después de la IA. Únicamente fueron utilizadas como donantes (n=13) aquellas hembras que proporcionaron un mínimo de 21 embriones clasificados morfológicamente como aptos para su transferencia, distribuyéndose en igual proporción entre los tres genotipos de receptoras (R, A y V). La dotación embrionaria individual de cada donante fue transferida equitativamente (7-14 embriones/receptora) en los tres genotipos maternos. Se transfirieron un total de 453 embriones (151 en cada genotipo) en 39 hembras mediante laparoscopia. En la etapa prenatal se determinó la supervivencia embrionaria mediante laparoscopia a día 10 de gestación (embriones implantados sobre embriones transferidos) y gestacional a parto (gazapos nacidos vivos sobre embriones transferidos), así como las pérdidas fetales (gazapos no nacidos sobre embriones implantados). Además, se determinó el tamaño del feto por ecografía (My Lab 70 x V6 portátil-Esaote) durante la gestación a intervalos de 2 días, comenzando el día 10 y finalizando el día 27. A día de parto, se determinó el tamaño de camada y cada gazapo fue individualmente identificado mediante microchip, registrándose su peso. Durante la etapa postnatal hasta la edad de

sacrificio (63 días) se determinó la ganancia media diaria en la etapa de lactación y engorde, así como la supervivencia (lactación: gazapos destetados sobre nacidos vivos. Engorde: gazapos que alcanzan la edad sacrificio sobre gazapos destetados). Nuestros resultados indican una influencia del genotipo materno sobre la tasa de supervivencia embrionaria con una superioridad de los genotipos maternos (A y V) sobre el genotipo paterno R (0.62 ± 0.04 y 0.58 ± 0.04 vs 0.47 ± 0.04 para el genotipo A y V vs R, respectivamente). Sin embargo, no se observó ningún efecto en la supervivencia gestacional y en las pérdidas fetales. En cuanto al efecto del genotipo materno sobre el crecimiento prenatal, los resultados revelan que desde el día 10 hasta el día 19 no hay ningún efecto. Sin embargo, desde el día 21 se produce un incremento diferencial de la longitud del feto favorecido por el ambiente uterino de genotipo R, manteniéndose esta diferencia constante hasta el final de la gestación. No se observó un efecto en el tamaño de camada, pero sí en el peso al nacimiento, observándose un mayor peso para los gazapos desarrollados en el ambiente uterino del genotipo R (72.7 ± 2.2 g vs 67.0 ± 2.1 g y 61.7 ± 2.0 g, para el genotipo R vs genotipo A y V, respectivamente). Durante la lactación, el genotipo R presentó una mayor ganancia media diaria (21.1 ± 0.9 g/d vs 18.7 ± 0.8 g/d y 18.3 ± 0.7 g/d, para el genotipo R vs genotipo A y V, respectivamente). Sin embargo, durante la etapa de engorde no se observó ningún efecto. Asimismo la supervivencia postnatal tampoco fue afectada por el genotipo materno. Concluyendo que existe una influencia del efecto materno sobre la supervivencia embrionaria pero no sobre la supervivencia gestacional, ni sobre las pérdidas fetales y la supervivencia posnatal. Además, existe un efecto materno sobre el crecimiento prenatal y postnatal hasta la lactación, pero este efecto es compensado durante el engorde.

Palabras claves: efecto materno; tasa; gestación; supervivencia; embrión; genotipo

ABSTRACT

Nowadays, the influence of maternal and prenatal embryonic genotype on prenatal survival is not clear. However, it is known that mother's genotype (uterine environment) can affect fetal and postnatal development. While several studies have referred prenatal survival with the maternal genotype, others suggest that the embryonic genotype may modify the uterine environment. Consequently, the prenatal survival depends not only of maternal factors. These effects have been shown in the rabbit, however, this study aimed to evaluate the effect of different maternal environments on the embryonic and gestational survival. In addition, we also study the effect of this maternal environments in the rabbit's growth at prenatal and postnatal stage. The maternal effect was determined by comparing three different genotypes, two of them selected by reproductive characters, but with different genetic selection methods (genotype A and V), and the third selected by average daily gain during fattening (genotype R). To rule out the effect of embryonic genotype, all embryos were obtained from genotype R. Donor rabbit (n = 39) were superovulated with a subcutaneous injection of corifollitropin alfa (0.75 µg/kg, Elonva®). Sixty hours later, they were inseminated (AI) and induced to ovulate, recovering embryos 72 h after AI. Only, the females who provided at least 21 embryos were classified as transferable and used as donors (n = 13). Embryos were distributed in the three receptor genotypes (R, A and V), transferring between 7 to 14 embryos per recipient. In total, 453 embryos (151 in each genotype) were transferred by laparoscopy in 39 females. Embryonic survival (embryo implanted/embryos transferred), gestational survival (kits born alive/embryos transferred) and fetal loss (rabbits unborn/implanted embryos) was determined by laparoscopy at 10th day of gestation. In addition, the size of the fetus was determined during gestation by ultrasound (My Lab 70 x V6 portatil-Esaote) at intervals of 2 days, starting on day 10 and ending on day 27. Litter size was determined and each newborn was individually identified by microchip and weighted. The daily middleweight gain (DMG) was estimated until the age of 63 days, and also the survival rate during this stage was calculated. DMG was calculated during the lactation and fattening (until 63 days). Our results shown that embryonic survival rate was influenced by maternal genotype, being higher in the maternal genotypes (A and V) than in the paternal genotype R (0.62 ± 0.04 and 0.58 ± 0.04 vs 0.47 ± 0.04 for genotype A and V vs R, respectively). However, in the survival gestational and fetal losses any effect was observed. On prenatal growth, any effect between 10 to 19 days of pregnant was noticed. However, from day 21 of pregnant, the fetus in the uterine environment of R genotype increase their body length, maintaining this difference until the birth. Although

any effects were observed on litter size, the weight at birth showed a higher value for the fetus developed in the uterine environment of genotype R (72.7 ± 2.2 g vs 67.0 ± 2.1 g and 61.7 ± 2.0 g for R vs genotype A and V, respectively). During lactation, R genotype reached the highest DMG (21.1 ± 0.9 g/d vs 18.7 ± 0.8 g/d and 18.3 ± 0.7 g/d, for genotype R vs genotype A and V, respectively). However, during the fattening stage, the postnatal survival and DMG were not affected by maternal effect. In conclusion, maternal effect has an effect on embryonic survival but not in gestational survival, fetal loss and postnatal survival. In addition, the maternal effect on the fetal growth and until lactation was observed, later this effect is compensated during fattening stage.

Keywords: maternal effect; rate; gestation; survival; embryo; genotype

ÍNDICE GENERAL

1.-INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Supervivencia prenatal	2
1.3. Crecimiento y su relación con la reproducción	5
1.4. Desarrollo prenatal	9
1.5. Supervivencia posnatal	13
1.6. Desarrollo posnatal	15
2.-OBJETIVOS	17
3.-MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1.-Declaración ética	18
3.2.-Animales	18
3.4.-Biotecnologías y procedimientos	21
3.4.1. Producción de embriones: Tratamiento de superovulación	21
3.4.2. Inseminación artificial (IA)	21
3.4.3. Sincronización de las hembras receptoras	21
3.4.4. Recuperación de embriones	22
3.4.5. Trasferencia de embriones por laparoscopia	23
3.4.6. Ecografías por ultrasonidos	25
3.5.-Determinaciones	26
3.5.1. Etapa de gestación	26
3.5.2. Etapa de lactación (desde el nacimiento hasta el destete)	27
3.5.3. Etapa de engorde (desde el destete hasta el sacrificio)	28
3.6. Análisis estadístico	28
3.6.1. Superovulación	29
3.6.2. Supervivencia prenatal	29
3.6.3. Crecimiento prenatal	29
3.6.4. Supervivencia posnatal	30
3.6.5. Crecimiento posnatal	30
4.-RESULTADOS	31
4.1. Superovulación	31
4.2. Supervivencia prenatal y pérdidas fetales	32
4.3. Crecimiento prenatal	33
4.4. Tamaño de camada y peso a nacimiento	34
4.5. Supervivencia posnatal	35
4.6. Crecimiento posnatal	35
5.-DISCUSIÓN	37
6.-CONCLUSIONES	44
7.-BIBLIOGRAFÍA	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El ultrasonido como método de monitoreo.....	12
Figura 2. Animales utilizados.	18
Figura 3. Representación esquemática del diseño experimental.....	20
Figura 4. Evaluación del estado de receptividad de la receptora.....	22
Figura 5. Grupo de embriones clasificados como aptos para la transferencia.....	23
Figura 6. Valoración del aspecto externo de los ovarios y conteo de la tasa de ovulación.	23
Figura 7. Colocación de la coneja en posición decúbito trendelenburg para la laparoscopia..	24
Figura 8. Secuencia de pasos de la transferencia de embriones por laparoscopia..	25
Figura 9. Conteo de los embriones implantados por laparoscopia.	26
Figura 10. Medidas por ultrasonido de la longitud del feto.	26
Figura 11. Registros al día de parto.	27
Figura 12. Diagrama de cajas y bigotes del tratamiento de superovulación.....	31
Figura 13. Media \pm S.E. para la tasa de supervivencia prenatal y de las pérdidas fetales.....	32
Figura 14. Media \pm S.E. para la medición de la longitud del feto durante la gestación.....	33
Figura 15. Media \pm S.E. para la supervivencia postnatal.	35
Figura 16. Media \pm S.E. para la determinación de la GMD postnatal.	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto del genotipo materno sobre el tamaño de camada y peso al nacimiento.	34
--	----

1.-INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

Hoy en día el constante aumento en el desarrollo demográfico mundial, que probablemente llegue a los 12.000 millones de habitantes en las próximas décadas, es motivo de intranquilidad en la comunidad científica internacional. Ello ha motivado a los países tanto desarrollados como a los que están en vías de desarrollo a interesarse cada vez más en “biotecnologías de reproducción” aplicadas a la producción animal, con el fin de aprovechar al máximo el potencial biológico de los animales a un ritmo mucho más rápido que lo alcanzado por la reproducción y producción animal convencional (Smidt & Niemann, 1999; Baldassarre, 2007).

La producción europea de carne de conejo es de aproximadamente 489.569 tm, lo que corresponde a una cuota del 30% de la producción mundial. Además, la producción cunícola representa la segunda especie en animales sacrificados al año en la Unión Europea, con 331.956.000 cabezas en el 2012 (FAOSTAT, 2016). No obstante, debido al bajo impacto económico de su valor, este animal es como mucho el menos estudiado de las especies de producción de carne en términos de bienestar animal (EFSA, 2005). La mayor producción se concentra en la región del mediterráneo, donde Italia es el principal productor (262500 tm). El segundo lugar lo ocupa España con 67500 tm y Francia el tercero (52915 tm). También en las estadísticas de la FAO, algunos países con una producción de conejo comercial significativa como Holanda y Bélgica aún son insuficientes. Además, entre los países no comunitarios, los principales productores son Ucrania, la Federación de Rusia, Bulgaria y Rumania (FAOSTAT, 2016).

El éxito o fracaso de la reproducción en conejos depende de varios factores (multifactorial), como son: la producción, la genética, el manejo, la sanidad y la alimentación; entre otros. Un ejemplo son las características del crecimiento y rendimiento de la canal en líneas maternales, que se ha comprobado que pueden estar influenciados por los efectos uterinos, efectos del desarrollo posnatal y otros efectos (Cowley *et al.*, 1989). También la tasa de supervivencia prenatal se ve afectada por varios factores genéticos y ambientales que alteran el desarrollo normal del embrión, el ambiente maternal para soportar la fecundación normal y el desarrollo de los embriones, la placenta y el feto, o afectar a la relación necesaria entre el embrión y el endometrio maternal (Wilmot *et al.*, 1986). Recientemente Vicente *et al.* (2012) comprobaron las influencias de tipo genético embrionarias en ambas tasas (la

de implantación y de supervivencia del feto), siendo la más afectada la tasa de implantación.

El estudio de los componentes tamaño de camada en conejos es uno de los caracteres tradicionalmente utilizados en la selección de líneas maternas, lo que permite una mejor comprensión de su control genético. Sin embargo, estos componentes en las líneas seleccionadas por índice de conversión, velocidad de crecimiento, etc. están muy poco estudiados. Estas diferencias han sido descritas a nivel de pérdidas prenatales en las líneas de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). La línea seleccionada por ganancia media diaria en el período de engorde (denominada línea R) presenta un porcentaje de pérdidas que puede llegar hasta un 50%, mientras que líneas maternas y conejas híbridas suelen presentar entre un 20-30% (García & Baselga, 2002; Vicente *et al.*, 2013).

Actualmente el conejo también es utilizado como una especie de “*modelo*” para el desarrollo de biotecnologías reproductivas, como la clonación (Chesné *et al.*, 2002) y la transgénesis (Bosze, 2010). También se utiliza como un modelo relevante para estudiar los efectos de la nutrición materna, en particular para los nutrientes que participan en el metabolismo de los lípidos (Palinski & D’Armiento, 2001; Montoudis *et al.*, 2004) o hipertensión materna (Denton *et al.*, 2003) en el desarrollo de la placenta y en la salud de la descendencia. En vista de las necesidades metabólicas similares (Liu *et al.*, 1996) y de la tasa de activación del genoma embrionario (Christians *et al.*, 1999). En las primeras etapas de desarrollo entre la humana y el embrión de conejo, y debido a su placentación hemocorial que es más similar a la placenta humana que a la de otras especies domésticas; el conejo aparece como un *modelo* interesante para estudiar los efectos a largo plazo, debido a las perturbaciones tempranas de la vida embrionaria (es decir, la producción *in vitro* o condiciones maternas alteradas, etc.).

1.2. Supervivencia prenatal

A pesar de la información disponible sobre la cantidad y distribución de la mortalidad prenatal en el conejo basándose en los estudios pioneros de Adams en el 1960, poco se sabe de la forma en que la mortalidad está relacionada con las diferentes etapas de la preñez. Las estimaciones previas de la mortalidad prenatal en el conejo doméstico se han basado en el recuento del cuerpo lúteo, lugares de implantación y los fetos vivos; cuyos datos se obtenían normalmente a través de autopsias al final de la gestación. Estas estimaciones según Allen *et al.* (1947) presentaban limitaciones e incorporaban errores inherentes al recuento de cuerpos lúteos y los lugares de implantación. Una estimación más fiable se obtuvo al hacer en primer lugar un

recuento mediante laparotomía tras la implantación, seguido de un segundo recuento a través de autopsias (corto plazo) o en el momento del parto. Si este procedimiento se combinaba con una cuantificación de los puntos de implantación (mediante laparotomía) también era posible obtener información sobre la etapa de gestación y cuando se producen las pérdidas (Adams, 1960).

En una revisión detallada acerca de la supervivencia prenatal en líneas seleccionadas por tasa de ovulación y capacidad uterina, Santacreu (2006) refiere que es un carácter importante en producción animal; de hecho, una elevada supervivencia prenatal conduce a un mayor tamaño de camada al nacimiento y consecuentemente a mayores beneficios económicos. El tamaño de camada al nacimiento es el resultado de una secuencia de sucesos: ovulación, fecundación y viabilidad de los embriones hasta el momento del parto. La mayoría de los estudios en conejo encuentran que la captación de los óvulos producidos por el ovario y su posterior fecundación son fenómenos de gran eficacia y responden a la "ley del todo o nada". En esencia, se puede considerar que el número de nacidos es un carácter resultado de dos componentes principales: la tasa de ovulación y la supervivencia prenatal. La supervivencia prenatal en conejo es de aproximadamente un 70% de los óvulos liberados por el ovario (Adams, 1960), cifra que es similar a la observada en otras especies polítopas (Blasco *et al.*, 1993).

Las pérdidas que se producen durante la gestación pueden ser de naturaleza diversa atendiendo al período en el que se dan. Si las pérdidas son previas a la implantación, éstas pueden ser debidas a un ambiente oviductal y uterino inadecuado o a la baja calidad de los óvulos (inmaduros o envejecidos), la cual podría estar ocasionada tanto por dietas inadecuadas, así como por tratamientos sanitarios o manejos estresantes. Las pérdidas post-implantación coinciden con el período de máxima tensión uterina sobre los fetos y puede venir determinada por la competencia entre éstos por el espacio, por carencias nutricionales, estados patológicos, y de nuevo por situaciones de estrés (tales como inclemencias del tiempo o modificaciones estructurales en granja) que provocarán en algunos casos reabsorciones completas y en otros abortos, dependiendo del momento de la gestación en curso (Vicente & Viudes-de-Castro, 2000).

La mortalidad prenatal es un fenómeno observado en todos los mamíferos estudiados, aunque existe diferencias significativas entre especies en la medida y el momento de la mortalidad. Es importante caracterizar las causas ya sea desde un punto de vista biológico, para entender por qué la mortalidad prenatal continúa ocurriendo pese a la selección natural a favor de la reproducción eficiente, o desde un punto de vista

práctico, si el conocimiento se puede utilizar para aumentar la supervivencia del embrión (Wilmut *et al.*, 1986).

La muerte prenatal puede ocurrir debido a varios factores como genéticos y ambientales que alteran el desarrollo embrionario normal, el ambiente materno para soportar la fecundación adecuada, el desarrollo de los embriones, placenta y fetos, o afectar la relación necesaria entre el embrión y el endometrio (Pope & Xie, 1989). Entre los factores genéticos hay que considerar los de la madre, los del embrión y sus interacciones. Tanto en conejo como en otras especies, parece que el genotipo de la madre es el que juega el papel más importante en la supervivencia prenatal, mientras que el genotipo del embrión tiene un papel menos relevante (Blasco *et al.*, 1993; Mocé *et al.*, 2004). La transferencia recíproca de embriones entre hembras de diferentes líneas o razas es una técnica muy útil, que permite separar los efectos de la madre, el embrión y las interacciones. Además, el conejo, donde la ovulación es inducida por el coito y donde no hay migración embrionaria entre cuernos uterinos, es una especie particularmente adecuada para este tipo de estudios.

Los factores ambientales son de dos tipos, los que denominamos efectos sistemáticos, llamados también efectos fijos, y que actúan aumentando o disminuyendo el valor de un carácter en todos los individuos (por ejemplo, el efecto del verano deprime el crecimiento de los animales y el invierno tiene un efecto favorable), y los efectos aleatorios, que están causados por infinidad de pequeños factores con un peso muy pequeño cada uno de ellos, y que inciden aleatoriamente sobre los individuos aumentando o disminuyendo el valor del carácter o caracteres en los que se está interesado (Blasco, 2010).

En conejos, las pérdidas desde la fecundación a la implantación (alrededor del día 7 de gestación) se han estimado en torno al 14% (Tao & Niemann, 2000; Santacreu & Mocé, 2005). Aunque existe variabilidad entre razas y líneas, la tasa de fertilización es generalmente alta, cerca del 95% (Adams, 1960; Peiró *et al.*, 2007). Las pérdidas de embriones tempranos pueden resultar si hay un desarrollo anormal heredado, la etapa embrionaria del desarrollo no es el correcta para el ambiente uterino común, el patrón esteroideogénico es inadecuado (Yoshinaga, 1988). O la distribución de los embriones dentro del útero es inadecuada (Hoffman *et al.*, 1998).

Las pérdidas después de la implantación son alrededor de 20% en conejos (Adams, 1960; Blasco *et al.*, 1994). Posteriormente a la implantación, el desarrollo fetal y de la placenta está influenciado por factores endocrinos primarios como la progesterona, los

factores de crecimiento tipo insulina, estradiol o prostaglandina (Crossey *et al.*, 2002); por la respuesta inmunológica (Bergeron, 1996; Pandian *et al.*, 1988); por la nutrición y el suministro vascular en el útero (Hafez & Tsutsumi, 1966), y por la disponibilidad de espacio (Argente *et al.*, 2008). En conejos, hay tres momentos críticos para la supervivencia fetal; el primero entre los días 8 y 17 de la gestación, cuando la placenta hemocorial ha terminado su desarrollo y la nutrición del feto comienza a ser controlada por la placenta hemotrofa (Adams, 1960). Un segundo pico de la mortalidad se produce entre 17 y 24 días post-coito, que se corresponde con el período agrandamiento uterino, cuando la tensión en el *conceptus* esférico está en un máximo y la sangre que fluye a través de los vasos maternos del útero disminuye (Hafez & Tsutsumi, 1966). El tercero puede tener lugar en la última semana de gestación, cuando los requerimientos de energía para el crecimiento del feto aumentan con rapidez, mientras que la ingestión de alimento disminuye en los días anteriores al nacimiento (Fortun-Lamothe, 2006).

Además, la lactancia y nutrición o el estrés por calor pueden provocar una energía desfavorable y/o desequilibrio endocrino de las conejas, incrementando los fallos en el proceso de la fertilización, la adhesión y placentación, o reduciendo el flujo sanguíneo uterino y el desarrollo fetal. En este sentido, la lactancia tiene un efecto perjudicial sobre la receptividad, la tasa de preñez, la viabilidad prenatal (Fortun *et al.*, 1993). El efecto del estrés por calor según Wolfenson & Blum (1988) se relaciona con la formación del blastocisto, mientras que la alimentación está vinculada a la calidad de los ovocitos, embriones y el desarrollo fetal. Factores derivados de la nutrición pueden dar lugar a reservas desequilibradas de energía, el soporte endocrino de la gestación y el flujo sanguíneo uterino (Fortun-Lamothe, 2006).

1.3. Crecimiento y su relación con la reproducción

En el desarrollo de gazapos existen varios factores de influencia. Se conocen marcadas diferencias en el tamaño corporal de las diferentes razas o líneas de conejos. En la composición genética específica de las razas o líneas, no sólo es determinante la capacidad de crecimiento alcanzable de animales adultos; sino también la intensidad del crecimiento, la cual puede ser registrada como la ganancia diaria de peso en la fase de crecimiento. Además, el estado sanitario de la población y, sobretudo la del animal individual, tiene una importancia decisiva para el éxito en el engorde. En adición a esto, se expresa el ambiente correspondiente con sus diferentes facetas en el desarrollo de los gazapos. En primer lugar, es fundamental el suministro de nutrientes, puesto que la masa corporal sólo puede ser formada cuando están

disponibles los nutrientes y la energía metabolizable (Petersen & Martínez-Vásquez, 2007). En las primeras fases de desarrollo de un embrión le corresponde únicamente a la madre el suministro de nutrientes. Este se produce durante la primera fase de la gestación mediante la circulación de la sangre materna. Antes del nacimiento se canalizan los nutrientes a través de la placenta directamente en la sangre de los embriones y/o fetos. Después del parto la coneja inicia la producción láctea para transmitir a sus crías los nutrientes necesarios vía ingesta de leche. En los primeros 21 días de edad los gazapos se alimentan casi exclusivamente de leche materna, de tal manera que el peso corporal de los individuos de una camada refleja la capacidad productiva de la madre.

En los últimos años se ha producido un incremento notable de las publicaciones sobre la hipótesis del "origen fetal" (Barker, 1992), en cierta medida de la mano de los nuevos conocimientos sobre epigenesis. Este concepto implica que un estímulo actué durante períodos críticos del crecimiento y el desarrollo del feto; lo cual puede resultar en adaptaciones del desarrollo que cambian permanentemente la estructuración, fisiología y metabolismo de la descendencia. Al respecto se ha publicado recientemente que la variación en el suministro de nutrientes durante la vida fetal y en concreto una desnutrición, pueden afectar el desarrollo corporal. La desnutrición materna también afecta a la eficiencia del crecimiento y la composición corporal (Caton *et al.*, 2009). Es conocido en mamíferos que el período fetal es crucial tanto para el desarrollo del músculo esquelético como del tejido adiposo (Taylor & Poston, 2007). En cuanto a los efectos de la desnutrición materna en crías de conejo si existe evidencia de estudios realizados en términos de pesos y abortos maternos (Nafeaa *et al.*, 2011), en tamaño de la camada, así como el peso de las crías y la tasa de supervivencia (Matsuoka *et al.*, 2006).

Pero hasta donde sabíamos en conejos ningún estudio se había publicado sobre los efectos de la desnutrición materna en los parámetros de producción de las crías; hasta que recientemente Symeon *et al.* (2015) evaluaron los efectos de un 50% desnutrición de las conejas sobre el crecimiento, la calidad de la carne y la composición de la canal de las crías. Estos autores aplicaron un período de subnutrición durante dos períodos de la gestación (en fase inicial de la organogénesis: 7-19 días y en la última etapa de rápido crecimiento de los fetos: 20-27 días) y demostraron que, durante el período de gestación, con la subnutrición temprana se presentan algunos abortos y que en la subnutrición tardía (cuarta semana) las conejas pierden peso significativamente en comparación con los demás grupos evaluados. Además, el peso al nacimiento tiende a

ser menor, pero durante el engorde el peso corporal y el consumo de alimento no se ve afectado. Estos resultados en conejos fueron también descritos por Manal *et al.* (2010). Recientemente también se ha demostrado que programas de alimentación a voluntad durante la etapa de gestación de las conejas da lugar a una mayor toxemia de las hembras; lo que incrementa la mortalidad tanto en las hembras como en los gazapos recién nacidos durante el parto (Martínez-Paredes *et al.*, 2012).

En cuanto al tamaño de la camada al nacimiento, se ha observado que una reducción de la alimentación durante la gestación no afectan al tamaño de misma (Matsuoka *et al.*, 2006). En estudios anteriores, con niveles de alimentación similar a Symeon *et al.* (2015), las reducciones del peso fetal no se produce (Matsuzawa *et al.*, 1981; Petrere *et al.*, 1993). Sin embargo, estos resultados son algo contradictorios, ya que otros estudios han mostrado una reducción del peso fetal (Cappon *et al.*, 2005), de igual forma que con niveles de alimentación más bajos (Matsuzawa *et al.*, 1981; Clark *et al.*, 1986; Petrere *et al.*, 1993). Probablemente, el factor crítico que influye es el estado físico y nutricional de la hembra antes del período de gestación. Al respecto, parece ser que, si es bueno una desnutrición por debajo del 50% de las necesidades energéticas para disminuir la cantidad de nacidos muertos, esto puede suponer considerables pérdidas del peso de las crías al nacimiento.

Otro factor a tener en cuenta es el metabolismo energético de la hembra durante la gestación, el cual está íntimamente relacionado con las pérdidas gestacionales. Este metabolismo energético está regulado en gran medida, por factores de crecimiento similares a la insulina que tienen un efecto metabólico importante en la supervivencia tanto embrionaria como fetal, dado que son factores secretados por el embrión y por la placenta, con efectos tanto autocrinos como paracrinos. Un ejemplo de esto es la regulación del angiogénesis por parte del factor de crecimiento insulínico tipo II (IGF-II) en el epitelio, incrementando la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (Herr *et al.*, 2003). Por otro lado, estos factores de crecimiento parecen tener efecto en la producción de reguladores de la implantación, como las integrinas (receptores de osteopontina) (Clemmons & Maile, 2005) y factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta (Li & Geng, 2010).

También hay que reconocer la importante función de la leptina, la cual está íntimamente relacionada con las funciones reproductivas, y se conoce como la hormona reguladora de la obesidad. Estudios con ratones homocigotos para una mutación en el gen que codifica para la leptina (gen *ob*) muestran que éstos presentan obesidad e infertilidad (Zhang *et al.*, 1994). De hecho, según Agarwal *et al.* (1999)

está demostrado que la leptina tiene efectos inhibitorios en la producción del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I). Los que mediados vía óxido nítrico (NO, del inglés 'Nitric oxid'), aumentan la producción de 17β -estradiol por parte de las células de la granulosa (Huang *et al.*, 2005). Esto debido a la inhibición de la actividad aromatasas por parte de la leptina y del NO (Chun *et al.*, 1995; Masuda *et al.*, 1997; Yamauchi *et al.*, 1997). Dado que el estradiol es el principal factor luteotrófico en conejo, esta regulación tendría especial importancia en dicha especie, donde un exceso de leptina podría desencadenar problemas en la ovulación, o bien, en la calidad de los óvulos producidos. Además, el estudio realizado por Huang *et al.* (2005) demuestran que este efecto inhibitorio por parte de la leptina de la producción de IGF-I se ve atenuado cuando se administran inhibidores del enzima NO sintasa (NOS).

Según Cunningham *et al.* (1999) la disponibilidad de energía influye en la aptitud reproductiva. Inclusive, la actividad del eje reproductivo es sensible a la adecuación de la nutrición y de los nutrientes de reserva metabólica. La hormona leptina derivada de los adipocitos se postula para reflejar el estado de las reservas de la nutrición y energía al servir como una puerta metabólica para el sistema reproductivo. Genéticamente ratones obesos (que carecen de leptina endógena) son infértiles, y el tratamiento de estos animales con la leptina exógena estimula la actividad de la reproducción y del sistema endocrino e induce la fertilidad en ambos sexos. Los animales con una severa restricción de alimentos han reducido los niveles circulantes de leptina, los que se asocian con la secreción marcada y reducida de las gonadotropinas (hormona luteinizante [LH] y hormona folículo estimulante [FSH]). El tratamiento con leptina exógena en ratones, ratas, ovejas y monos, estando además sometidos a una restricción de alimentos, revierte la inhibición de la secreción de gonadotropinas. A pesar de este debate, lo que sí es indiscutible para todas las especies estudiadas hasta la fecha, es que los niveles adecuados de la leptina en la circulación son esenciales; pero no suficientes para la progresión de la pubertad y que el tratamiento con leptina puede revertir el retraso en la maduración sexual causada por la restricción de los alimentos.

Un creciente cuerpo de evidencia inequívocamente apunta a una estricta inter-relación entre la nutrición y la reproducción. Por lo cual, se examina el caso paradigmático de la leptina para descubrir la relación de la nutrición y fisiología, los mecanismos celulares y moleculares. La presencia de receptores de leptina (Ob-R) en el ovario, oviducto, el hipotálamo y la hipófisis anterior sugiere que la leptina está involucrada en una gran variedad de acciones reguladoras en los diferentes niveles del eje

hipotálamo-hipófisis-ovario (HPO) del conejo. La leptina a nivel del tejido lúteo, aumenta la síntesis prostaglandina F₂α (PGF₂α), pero inhibe la liberación de progesterona, utilizando respectivamente, las vías de JAK / STAT y MAPK. En los oviductos, la leptina inhibe la PGF₂α, pero estimula la síntesis de dinoprostona (Boiti, 2004). Hay que considerar también que un desdén nutricional, provocado por 48 h de ayuno antes de la inseminación artificial (IA), deprime todos los parámetros reproductivos, reduce la frecuencia de pulso y amplitud del estradiol-17β, disminuye la oleada y el pico de LH siguiendo con la inyección de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), reduce la regulación de la expresión de los receptores de estrógeno (RE) en la pituitaria anterior, y causa una caída en las concentraciones de leptina en plasma. Aunque la secreción de leptina parece estar regulada por la ingesta de calorías en lugar de por la masa adiposa, estos hallazgos en conjunto soportan que la leptina puede actuar como una señal metabólica para encender o apagar la actividad reproductiva.

1.4. Desarrollo prenatal

Según Vicente & Viudes-de-Castro (2000) si la monta ha desencadenado la ovulación y los óvulos han sido fecundados, los cigotos o embriones resultantes alcanzarán el útero entre las 72 y 80 horas post-coito. Una vez en el útero y hasta el día 5, los embriones colonizan progresivamente los cuernos uterinos, distribuyéndose al azar. Sin embargo, entre los días 6 y 7 se observa ya una distribución equidistante de los mismos a lo largo del cuerno uterino que los contiene. En esta etapa, los blastocistos incrementan su diámetro desde 1 a 5 mm. La expansión del blastocisto no sólo provoca dicho espaciamiento, sino que, además determina finalmente su inmovilización, quedando ya establecida la posición definitiva que ocupará cada embrión en el cuerno uterino durante la gestación. El inicio y suministro de nutrientes de la madre al embrión se produce mediante la placenta (vía sanguínea). Siete días post-coito se observan dilataciones antimesometriales, a modo de pequeñas hinchazones translúcidas, en las que se encuentran cada uno de los embriones, con el embrioblastema ubicado en posición mesometrial. Entre los días 10 y 17 se constituirá y desarrollará la verdadera placenta corioalantoidea. El feto alcanza su máximo incremento de tamaño en la cuarta semana de gestación y el parto tiene lugar 30-32 días post-coito, en función del número de fetos gestados y de la estirpe genética.

Para entender la complejidad de la reproducción y del desarrollo prenatal, a menudo es necesario desarrollar métodos en los animales vivos, para así detectar y visualizar el desarrollo de los numerosos eventos desde la inseminación hasta el nacimiento.

Hasta hace poco tiempo, la experiencia y el equipamiento necesario para llevar a cabo estas tareas en una amplia gama de especies no estaban ampliamente disponibles. Posteriormente, la caracterización del desarrollo embrionario y fetal fue en gran parte limitada a los exámenes post-mortem, representando sólo pequeñas partes de estas acciones complejas (Kathleen-Roellig *et al.*, 2010). La llegada de la ultrasonografía ha representado una revolución en el campo de la reproducción. De hecho, hoy en día este método se utiliza de forma rutinaria en muchos animales, incluyendo los salvajes y exóticos para determinar la preñez (Hildebrandt *et al.*, 2000). El uso de los ultrasonidos es utilizado para los exámenes frecuentes, y consecutivos de los animales vivos, permitiendo la precisa cronología del desarrollo prenatal y el cálculo de la edad gestacional. Esta técnica se ha desarrollado hasta ahora en varias especies de animales, incluida el conejo (Börsch & Meinecke-Tillmann, 2004). Aunque es posible extrapolarla a partir de la edad gestacional de especies cercanas y relacionadas o del tiempo aproximado de la concepción; la ecografía nos permite examinar los mecanismos crípticos que pueden operar en diferentes especies, tales como retraso en la implantación, reabsorción del embrión y determinación precisa de la tasa de crecimiento, la interacción fetal y el comportamiento, todo lo cual proporciona una comprensión mucho más amplia del contexto reproductivo individual y de las estrategias evolutivas.

Otra de las ventajas del conejo es que su mayor tamaño en comparación con los roedores de laboratorio, permite la posibilidad de estudiar el desarrollo fetal por ecografía utilizando ecógrafos veterinarios convencionales. Además, la posibilidad de transferir embriones de diferentes orígenes o grupo de tratamiento de forma independiente en cada cuerno uterino (presenta 2 cervix) permite el estudio del crecimiento fetal de los dos diferentes grupos de fetos dentro del mismo ambiente materno. Aunque se han publicado varios estudios sobre el seguimiento ecográfico de conejas y liebres preñadas (Cubberley *et al.*, 1982; Griffin *et al.*, 2003), tan sólo hay un estudio en el que se ha descrito un seguimiento durante la gestación de la identificación de las estructuras fetales con la validación de las mediciones (Chavatte-Palmer *et al.*, 2008).

Existe en la literatura una considerable evidencia de que el retraso del crecimiento intrauterino conduce a un aumento de la sensibilidad a las patologías metabólicas en la edad adulta y en particular el síndrome metabólico (McMillen & Robinson, 2005). Incluso, cuando no se ve afectado el peso al nacer; por ejemplo, cuando la nutrición materna se reduce durante el período periconcepcional, los eventos que ocurren

durante el crecimiento embrionario y fetal puede jugar un papel crucial en el desarrollo de patologías del adulto como la dislipidemia u otras anomalías metabólicas (Roseboom, 2000). Entre los factores que afectan el crecimiento fetal en varias especies, se ha reportado el uso de técnicas de reproducción asistida, ya sea para inducir un mayor crecimiento del feto y de la placenta como en especies rumiantes (McEvoy *et al.*, 2000) o reducción del crecimiento fetal como se ve ha demostrado tras un procedimiento de fecundación *in vitro* en humanos (Olivennes *et al.*, 2002). Con el fin de monitorizar el crecimiento fetal, la ecografía por ultrasonido se usa rutinariamente en los humanos y las grandes especies domésticas, con fines de gestiones médicas, veterinarias y de animales.

Actualmente, ya existen publicados algunos trabajos que sirven de referencia para la estimación de la edad gestacional y la etapa del desarrollo prenatal, ya sea la embrionaria y/o fetal; aun así, sigue siendo escasa la información sobre la tasa de crecimiento prenatal en conejos. Destacamos los realizados por Chavatte-Palmer *et al.* (2008) en conejo y Roellig *et al.* (2010) en liebres europeas (*Lepus europaeus*).

Por otro lado, Blasco *et al.* (1999) describieron en sus análisis exploratorios que el crecimiento prenatal en porcino es de tipo exponencial, esto basado en el peso de la placenta y del embrión, el cual fue tomado en dos momentos (a los 30 y 50 días de gestación) en las cerdas gestantes sacrificadas. Los mismos, hicieron el análisis en una escala logarítmica para evitar un efecto de edad del embrión, así como un problema de heterocedasticidad de la varianza. En cuanto al efecto del tipo genético del macho y de la hembra, encontraron que el tipo genético el macho no afecta al desarrollo de la placenta fetal y su efecto sobre el peso del embrión no es significativo (30 días) o es muy reducido (50 días). No hay interacción entre tipos genéticos de macho y hembra. Hay, sin embargo, un fuerte efecto del tipo genético de la hembra, el cual explica la mayor parte de la variación observada después del efecto de día concreto de gestación. Hay también una interacción entre tipo de hembra y tipo de sacrificio, por lo que cabe suponer que el crecimiento de los embriones en los estadios tempranos de la gestación está ligado al tipo genético de la hembra. De todas formas, en los pesos de los embriones por tipo genético de hembra (estimados con un modelo reducido), varían de 1.69g a 1.89g en torno a los 30 días, y de 36.6g a 44.0g en torno a los 50 días, es decir, la variación entre los extremos está alrededor del 10% del valor del carácter; no se observan, pues, diferencias espectaculares entre cruzamientos.

En conejos caracterizaciones fiables sin necesidad de sacrificar al animal se pueden obtener mediante los procedimientos de laparoscopia, acorde a Santacreu *et al.* (1990) realizando los primeros los recuentos de supervivencia-pérdidas poco después de que la implantación se produjo (día 7 de gestación). Si este procedimiento se combina con la examinación ecográfica por ultrasonido y conforme a los criterios de Vicente *et al.* (2013) podemos monitorizar todo el desarrollo prenatal y corroborar el conteo laparoscópico, sobre todo en los embriones contabilizados como implantados; detectando en realidad cuando se producen las pérdidas (figura1); obteniéndose con ello datos más precisos y mediciones semanales durante toda la etapa de gestación.

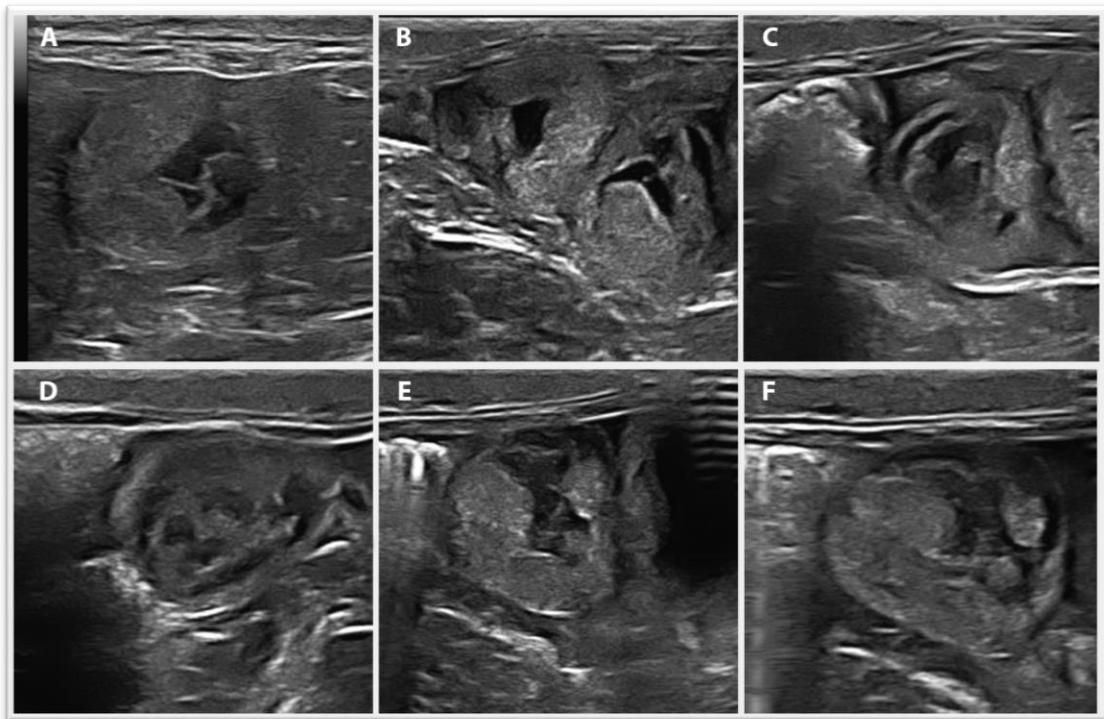


Figura 1. Ultrasonido doppler Eseaote-España (2016) tomado a los 14 días en la etapa de organogénesis. 1. A – B. Bolsa fetal sin contenido dentro; 1. C – F. Bolsa fetal con un feto en el interior en estado de regresión.

Por otra parte, Chavatte-Palmer *et al.* (2008) en un estudio de caracterización del crecimiento fetal por ecografía en conejos, describieron que todas las mediciones anatómicas aumentaron con la edad gestacional. En el día 7, era posible visualizar las vesículas fetales, pero la exactitud del conteo de vesículas no era muy satisfactoria ($R = 0.62$, $p < 0.01$). Sin embargo, ya en el día 9, la estimación del número de fetos implantados se había convertido fiable para estimar el tamaño de camada al nacer ($R = 0.92$, $p < 0.01$); pero no les fue posible asegurarse de que el mismo feto no se había contado dos veces o más en el grupo con un tamaño de camada de más de 6 fetos, y

por lo tanto no se calculó la exactitud. También encontraron que entre el día 7 y 19 existe una relación lineal entre la longitud de la vesícula y la edad gestacional ($y = 4.8597 + 0.3952x$, $R^2 = 0.89$; donde: y es la edad gestacional en días, x la longitud vesicular, $p < 0.001$). Similarmente, entre el día 13 y 27 existe una relación lineal entre la longitud del cuerpo (sin la cabeza) y la edad gestacional, ($y = 0.3455x + 11.959$, $R^2 = 0.94$, $p < 0.001$, donde x en este caso era longitud del cuerpo en mm). Además, vieron que a lo largo de la gestación los fetos del grupo con más cantidad de implantados tienen a menudo más pequeñas las vesículas y partes del cuerpo como la cabeza y el corazón; en comparación con los otros grupos de menor tamaño de camada, aunque esto no se observó para las mediciones de la placenta ni para el ritmo cardíaco, y las diferencias más consistentes fueron observadas en las últimas etapas de la preñez. Y curiosamente, el tamaño de los fetos del grupo control (criados de forma natural) no fue significativamente diferente de los otros tres grupos transferidos. Así mismo, la frecuencia cardíaca fetal no fue diferente entre los grupos, ni las mediciones placentarias.

En los estudios realizados por Wishart & Hammond (1933) y McEvoy *et al.* (2000) muestran que el tamaño del feto está directamente relacionado con el tamaño de camada, acorde con Chavatte-Palmer *et al.* (2008) quienes obtuvieron una influencia significativa del número de fetos en el tamaño fetal (mayor en las camadas más pequeñas) y la frecuencia cardíaca fetal (más elevada en las camadas más pequeñas). No obstante, describieron una notable variación de las mediciones fetales en animales con monta natural. También pudieron apreciar la vesícula a partir del día 7, y a pesar de la certeza completa sobre la presencia de la preñez, la misma sólo se podía confirmar en el día 9. Alrededor de esta etapa, se sabe que el surco neural se cierra (día 8.5) y que la estructura cardíaca se desarrolla junto al polo cefálico (día 9.5), con la curvatura dorsal, esbozo o yemas de las extremidades y las vesículas ópticas (Beaudoin *et al.*, 2003).

1.5. Supervivencia posnatal

Se describe en la bibliografía que la mortalidad posnatal en conejos se produce principalmente desde el nacimiento hasta el destete. Según Pérez (2015) en las líneas de la UPV, la mortalidad de líneas que han sido seleccionadas por tamaño de camada al destete (A y V) es menor a la de la línea seleccionada por velocidad de crecimiento (R). Las causas más frecuentes de mortalidad de los gazapos desde el nacimiento hasta que se destetan con 28 días son la mortalidad al parto, representando un 25% del total de la mortalidad ocurrida en el período. Durante la primera semana de vida, la

mayor causa de mortalidad es la inanición (representa alrededor de un 25%). En la segunda semana esta se produce principalmente por diarreas, si bien la mayoría mueren por causas desconocidas (no es común la realización de necropsias). Posteriormente, en las semanas 3 y 4 la mortalidad se reduce, siendo también los casos de diarrea la mayor causa. Esto hace que durante esta etapa las diarreas se presentan como la tercera causa de mortalidad más importante con unos valores de alrededor de un 21%.

Algunos estudios indican que la supervivencia en la primera semana está directamente relacionada con el tejido adiposo (Lebas, 2010). El tejido adiposo está constituido por tejido adiposo marrón (5.5% de peso corporal) y por tejido adiposo blanco (1.4% del peso corporal). El tejido adiposo marrón es utilizado por el conejo únicamente para su termorregulación; mientras que el tejido adiposo blanco es la reserva energética y su función es asegurar las demás funciones vitales. La temperatura de confort de un conejo recién nacido se sitúa en torno a 35-36°C, con dicha temperatura y si no se alimenta muere de hambre en 5-6 días, teniendo una pérdida casi total del tejido adiposo blanco, mientras que el tejido adiposo marrón no presenta pérdida alguna. Si se realiza la misma experiencia descendiendo la temperatura a 20-23°C, el gazapo morirá en 3 días, por ende, tendrá reserva de tejido adiposo blanco, pero no del marrón. Así que una ingestión de leche inmediatamente después del nacimiento permite que el gazapo no gaste su tejido adiposo blanco, y por lo tanto en gran medida a que aumente sus posibilidades de supervivencia. De esta forma, y con buenas condiciones térmicas la falta de alimento no es irreparable. De hecho, si el gazapo tiene en el estómago entre un 15-20% de la cantidad de leche ingerida ese día puede sobrevivir haciendo uso de sus reservas adiposas hasta la siguiente toma; sin embargo, si al día siguiente no mama morirá (Lebas, 2010).

El peso de los gazapos en los primeros días de vida está relacionado con la mortalidad. Pues cuanto más peso tiene un gazapo, más alta es la probabilidad de supervivencia, a ello también contribuye el contenido de grasa y las reservas energéticas, ya que estas ayudan a que el gazapo pueda sobrevivir más tiempo si no ha mamado. Por tanto, cuanto más peso y grasa, hay más probabilidad de sobrevivir durante los primeros días de vida (Lebas, 2010). En relación a esto hay varios estudios que sitúan el peso mínimo entre 25 y 35 g. Vicente *et al.* (1995) observaron que un 92% de los gazapos que pesan menos de 35 g al nacimiento mueren durante la primera semana. En otro estudio Argente *et al.* (1999) observaron que el peso mínimo de supervivencia se sitúa en torno a 25 g, y que el porcentaje de gazapos que maman

tienen siempre una mayor probabilidad de supervivencia; incluso para los gazapos que no maman con este peso mínimo, todavía tienen una probabilidad de supervivencia del 70%.

También se ha visto que el tamaño de camada influye en el peso al nacimiento de los gazapos, de hecho, se sabe que el aumento del número de nacidos vivos conlleva a un aumento de la mortalidad en los primeros días tras el parto (Poigner *et al.*, 2010). Camadas más grandes tienen gazapos con menos peso. Por otra parte, camadas muy grandes conlleva a que aumente de la competencia por el alimento hasta el momento en el que el gazapo empieza a consumir alimento sólido.

La sanidad es otro aspecto importante que hay que controlar para minimizar las enfermedades que afectan a la camada progresivamente. Dentro de las patologías más frecuentes, y que pueden aumentar la mortalidad de los gazapos, tenemos a las enteropatías como la colibacilosis y la salmonelosis. Por ello, si no se tiene una correcta higiene y manejo se pueden producir contaminaciones cruzadas, que en varias ocasiones pueden acabar con la camada entera. El estado de salud de la madre también hay que tenerlo en cuenta, pues la misma puede ser un foco de infecciones para los gazapos. En tal caso Roca & Mateo (2011) reportan que la mastitis puede aumentar la mortalidad de los gazapos, ya que la mama se enquista y no da leche. En ocasiones también podemos observar casos en los que algún gazapo es devorado total o parcialmente por la madre (canibalismo), cuyo comportamiento puede ser provocado por un parto defectuoso, por frío, falta de agua, alimentación defectuosa, la cama del nido, el estrés y algún tratamiento inadecuado. Ante ello, lo más importante es atender y dar prioridad al manejo frente a la mayoría de causas que provocan canibalismo, y no tanto pretender subsanarlo con tratamientos medicamentosos.

1.6. Desarrollo posnatal

Según Petersen & Martínez-Vásquez (2007) para el desarrollo de los gazapos después del nacimiento es fundamental el rendimiento lácteo de la coneja, así como el tamaño de la camada. De esto resulta teóricamente la disponibilidad de leche para cada gazapo en la camada. Una coneja amamanta no muy a menudo por día, y muchas veces sólo una vez. De aquí se formula el cuestionamiento sobre la producción de leche de las distintas tetas en la glándula mamaria de una coneja. Como se ha determinado en mediciones de la ingestión de leche en actos de amamantamiento, la producción de leche de las tetas disponibles en la ubre de una coneja no es de ninguna manera igual. La mayor excreción de leche se registra en las tetas de la segunda y tercera posición, donde las dos tetas enfrente de éstas apenas

se diferencian en la excreción de leche. Además, los gazapos jóvenes no tienen una posición fija cuando maman como ocurre con los marranos. Sin embargo, los gazapos más pesados y fuertes ocupan a menudo los lugares delanteros de la glándula mamaria, y por lo tanto maman más y tienen mayores probabilidades de sobrevivir.

Durante la etapa postnatal la capacidad de producción de leche es uno de los efectos maternos más importantes, de hecho, la misma condicionará de manera importante el desarrollo y supervivencia de los gazapos hasta el destete (Viudes-de-Castro & Vicente, 1989). Además, aún cuando la capacidad lechera de la coneja sea notable, si el número de gazapos lactantes es muy elevado, la competencia entre crías, tanto a lo largo de la gestación como de la lactación, penalizará el crecimiento de todos y cada uno de ellos (Torres *et al.*, 1986).

En efecto Rao & Sunki (1977) describen que el crecimiento de los conejos después del nacimiento es comparable al de los broilers. En muchas especies, el ritmo de incremento ponderal es exponencial hasta el destete y a partir de este momento, se transforma en una función lineal. En el conejo y en especial las estirpes selectas, esto no sucede hasta las 9-10 semanas de edad. Así pues, el conejo puede considerarse un animal de carnicería competitivo en términos de ritmo de crecimiento. Según Blasco (1999) el hecho es que en animales, los datos a considerar se mueven en un breve período de crecimiento exponencial en los primeros estadios de vida, un largo período lineal de crecimiento, y un período final de rápida desaceleración, para los que se podrían ajustar curvas diferentes si el interés del trabajo se centrara en uno u otro período.

Teniendo presente todos estos argumentos, y considerando además que los componentes de tamaño de camada y sus caracteres relacionados, aún siguen estando poco estudiados en esta línea paterna de crecimiento. Esta investigación constituye una necesidad de particular importancia, para así tener una mejor comprensión del control genético. Por consiguiente, en este caso se percibe implementar una estrategia que tiene como base las características biológicas de la especie con la aplicación de las biotecnologías reproductivas, para explotar al máximo el potencial reproductivo de estos animales con elevado valor genético, y en la medida de lo posible reducir el tiempo de obtención de los objetivos del programa de mejora genética, sin mermar los índices e indicadores productivos y con notables mejoras en la fertilidad y prolificidad, que pueden reportar beneficios para una adecuada gestión y difusión de la genética.

2.-OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio fue evaluar en cada etapa del desarrollo prenatal y postnatal el efecto de diferentes ambientes maternos sobre la supervivencia y las características de crecimiento.

De manera específica se percibe evaluar la influencia genética materna sobre:

- (i) la supervivencia prenatal (embrionaria y gestacional)
- (ii) las características del crecimiento prenatal
- (iii) la supervivencia postnatal durante lactación y engorde
- (iv) las características del crecimiento postnatal durante lactación y engorde

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.-Declaración ética

Este estudio fue aprobado por Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (código 2015/VSC/PEA/00061). El mismo se realizó en la granja experimental del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal perteneciente a la propia universidad; cuya duración fue desde septiembre de 2015 hasta junio de 2016. Todos los animales fueron manejados de acuerdo a los principios de cuidado animal publicadas por el Real Decreto Español 53/2013.

3.2.-Animales

Se utilizaron un total de 78 conejas (*Oryctolagus cuniculus*) de varios tipos genéticos (figura 2). Para ello como receptoras se emplearon dos genotipos maternos (línea A y V) y uno paterno (línea R). Los genotipos maternos fueron seleccionados respectivamente desde 1980 para el caso de la línea neozelandesa (línea A) por un índice familiar basado en el tamaño de camada al destete; y desde 1982 para el caso de la línea sintética (línea V) para incrementar el tamaño de camada al destete (Estany *et al.*,1989). Estos genotipos maternas se utilizaron como referencia, porque los componentes del tamaño de la camada y las pérdidas gestacionales han sido bien caracterizados en estudios anteriores (Garcia & Baselga, 2002). Mientras que el genotipo paterno (línea R) fue seleccionado a partir 1990 por selección individual de la ganancia media diaria, desde el destete hasta la edad de sacrificio (post-destete de 28 a 63 días, acorde a Estany *et al.* (1992). Este genotipo R fue el único empleado como donante de embriones.



Figura 2. Animales utilizados. A. Genotipo amarillo; B. Genotipo rosa; C. Genotipo verde.

Todos los animales se mantuvieron bajo las mismas condiciones de manejo, alimentación y tenencia, ubicados en jaulas individuales de cubierta plana, aplicándoseles un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, los mismos fueron alimentados con una dieta comercial (*ad libitum*) teniendo un libre acceso al agua. Todas las donantes fueron nulíparas del genotipo R; mientras que las receptoras para todos los genotipos (R, A y V) fueron hembras múltiparas (entre el tercer y sexto parto); trabajándose únicamente con receptoras en estado fisiológico no lactante.

3.3-Diseño del experimento

El diseño experimental se muestra en la figura 3. Se empleó un modelo equilibrado donde se utilizaron un total de 453 embriones en estadio de mórulas o blastocito temprano a las 72 horas tras la ovulación (procedentes de hembras la línea R sometidas a un tratamiento de superovulación). Fueron empleadas 13 hembras donantes, las que produjeron más de 21 embriones de buena calidad según criterios morfológicos. Posteriormente los embriones fueron divididos equitativamente y transferidos mediante la técnica de laparoscopia en las receptoras (N=13/genotipo materno). Con este modelo se evaluó el efecto materno sobre la supervivencia embrionaria y gestacional, así como el crecimiento prenatal y postnatal de la descendencia.

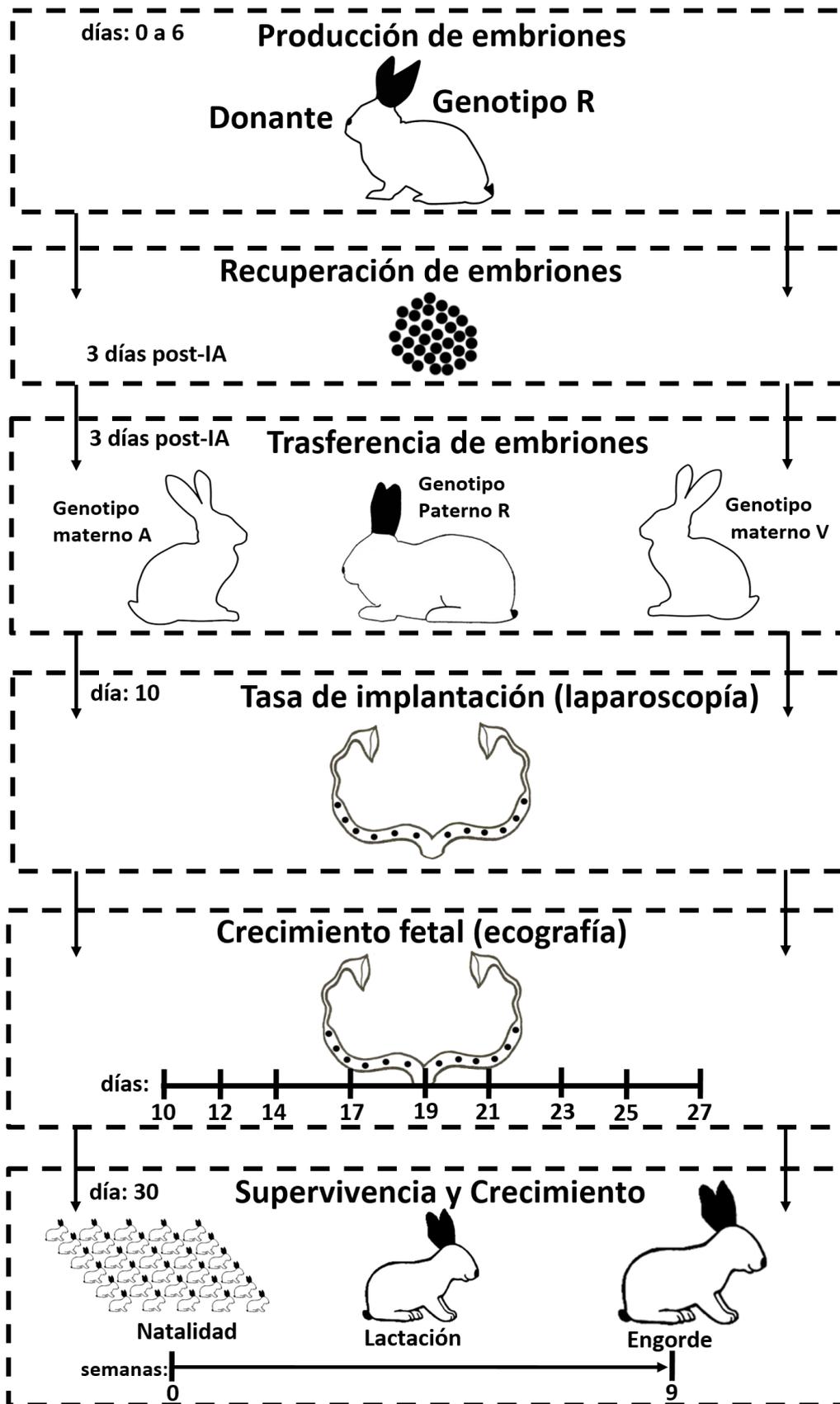


Figura 3. Representación esquemática del procedimiento experimental utilizado.

3.4.-Biotecnologías y procedimientos

Todas las biotecnologías y/o procedimientos que se detallan a continuación fueron utilizadas en este estudio.

3.4.1. Producción de embriones: Tratamiento de superovulación

Un total de 39 hembras nulíparas de la línea R fueron sometidas al tratamiento de superovulación mediante corifolitropina alfa de larga acción (Elonva®). La dosis empleada fue de 0.75 µg/kg de peso vivo, por vía subcutánea en una sola aplicación. Para ello se emplearon hembras cuyo peso vivo no fuese inferior a 4.5 kg, y la edad a partir de los 4.5 meses.

3.4.2. Inseminación artificial (IA)

Para la IA tuvimos en cuenta el control de la progenie, realizándosele en las hembras superovuladas con 0.5 ml de semen fresco diluido, cuya procedencia era de los machos individuales fértiles (60 horas después de la superovulación). La calidad seminal fue evaluada garantizando una motilidad superior al 75% y un nivel de morfoanomalías inferior al 25%, acorde con lo establecido (para más detalles, véase Lavara *et al.*, 2005). Además, se tuvo en cuenta que, en el parentesco entre los machos y las hembras a inseminar, no tuvieran un abuelo en común y que no se cruzasen padres con hijos. Inmediatamente después de la inseminación, la ovulación se indujo mediante una inyección intramuscular de un análogo sintético de la GnRH (Acetato de buserelina), suministrándose a razón de 1 µg/animal (Suprefact, Hoechst Marion Roussel, S.A., Madrid, Spain).

3.4.3. Sincronización de las hembras receptoras

La sincronización de las hembras receptoras (N=39) se realizó sobre animales múltiparos con un correcto estado sanitario (sin mastitis y problemas de patas, entre otros), una condición corporal adecuada y que presentaban un aspecto de vulva turgente y rojizo (figura 4). La sincronización se efectuó a la par de la inseminación artificial de las donantes, de forma que en el momento de la transferencia hubiese una sincronía entre el embrión y el ambiente uterino. Sobre estos animales se indujo la ovulación mediante el análogo sintético de la GnRH tal y como ha sido indicado anteriormente.



Figura 4. Evaluación del estado de receptividad de la receptora.

3.4.4. Recuperación de embriones

Para la recuperación de embriones se procedió al traslado de las donantes de la línea R a la sala de sacrificio para su eutanasia (72 horas post-inseminación). Para ello, se aplicó el método no cruento de electronarcosis a nivel de la cabeza con un equipo de bajo voltaje y con una tensión y frecuencia de tipo medio (valores de 49 V y 179 Hz, respectivamente); quedando insensibilizadas e inconscientes para posteriormente (antes de trascurrir 15 segundos) proseguir a desangrarlas a nivel de la zona ventral del cuello cortando ambas yugulares acorde con los principios de cuidado animal publicadas por el Real Decreto Español 53/2013.

Posteriormente se procede a la perfusión de cada oviducto y su respectivo primer tramo del cuerno uterino, usando un medio constituido por 10 ml solución salina precalentada (10 ml para cada lado) y tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) suplementado con 0.2% de albúmina de suero bovino (BSA) y antibióticos (300.000-IU de penicilina G sódica; 700.000-IU penicilina G procaínica; y 1250-mg de sulfato de dihidroestreptomicina). Los embriones recuperados y clasificados con morfología normal (presentan una etapa correcta de desarrollo, un tamaño celular homogéneo y aspecto del citoplasma, zona pelúcida esférica e intacta y la capa de mucina (figura 5), fueron mantenidos a temperatura ambiente (20-25°C) y en oscuridad hasta momento de la correspondiente transferencia en las receptoras. Los embriones procedentes de cada hembra donante siempre que sobrepasaron la cifra de 21 fueron empleados para su transferencia. Siempre respetando que el mismo origen embrionario fuese transferido en los tres ambientes uterinos en igual proporción.

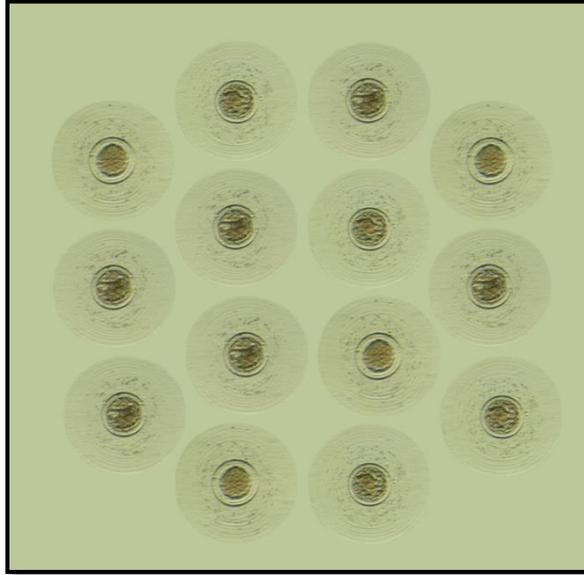


Figura 5. Grupo de embriones clasificados como aptos para la transferencia.

También se registraron datos complementarios, tales como: el aspecto de los ovarios y su respectiva tasa de ovulación (TO) (figura 6), así como la cantidad de embriones recuperados (ER) por hembra donante, delimitando los embriones normales, de los anormales (EA) y los óvulos (OV). Cuyos datos fueron utilizados posteriormente para describir la eficacia y respuesta al tratamiento de superovulación.



Figura 6. Aspecto externo de los ovarios evaluado a la hora de contar la tasa de ovulación.

3.4.5. Traslado de embriones por laparoscopia

Las conejas receptoras de los tres tipos genéticos (A, V y R) fueron trasladadas por vía laparoscópica (72 horas post-sincronización), siguiendo el procedimiento descrito por Besenfelder & Brem (1993).

Para ello, la sedación se indujo mediante una inyección intramuscular de 5 mg/kg de xilazina (Bayer AG, Leverkusen, Alemania). Después de haber transcurrido 15 minutos, la inducción de la anestesia se alcanzó administrando clorhidrato de ketamina por vía intravenosa con una dosis de 20 mg/kg de peso vivo (Imalgene, Merial SA, Lyon, Francia). Estando entre el segundo y tercer plano de la anestesia accedimos a la cavidad abdominal, maximizamos la visibilidad con ayuda del endoscopio y la exportamos al monitor a través de la cámara digital (figura 7); así que ubicamos nuestro punto de referencia unilateral (el ovario izquierdo o derecho según corresponda) e introducimos el catéter epidural por el oviducto aproximadamente a uno o dos cm (figura 8). Justo en ese momento se transfieren lentamente los grupos de embriones preparados (7-14 embriones/hembra), registrándose en todos los casos la identificación de la donante y receptora, cantidad de embriones transferidos (ET), así como la respectiva tasa de ovulación (TO) de la receptora (según el lado de la transferencia).



Figura 7. Colocación de la coneja en posición decúbito trendelenburg para la laparoscopia. En el centro se muestra el trocar intraabdominal, endoscopio y la cámara digital.

En todo momento se supervisó los signos vitales, los reflejos y efectos de la anestesia; siempre respetando los principios de sepsia y antisepsia con el menor tiempo posible de exposición durante el procedimiento.

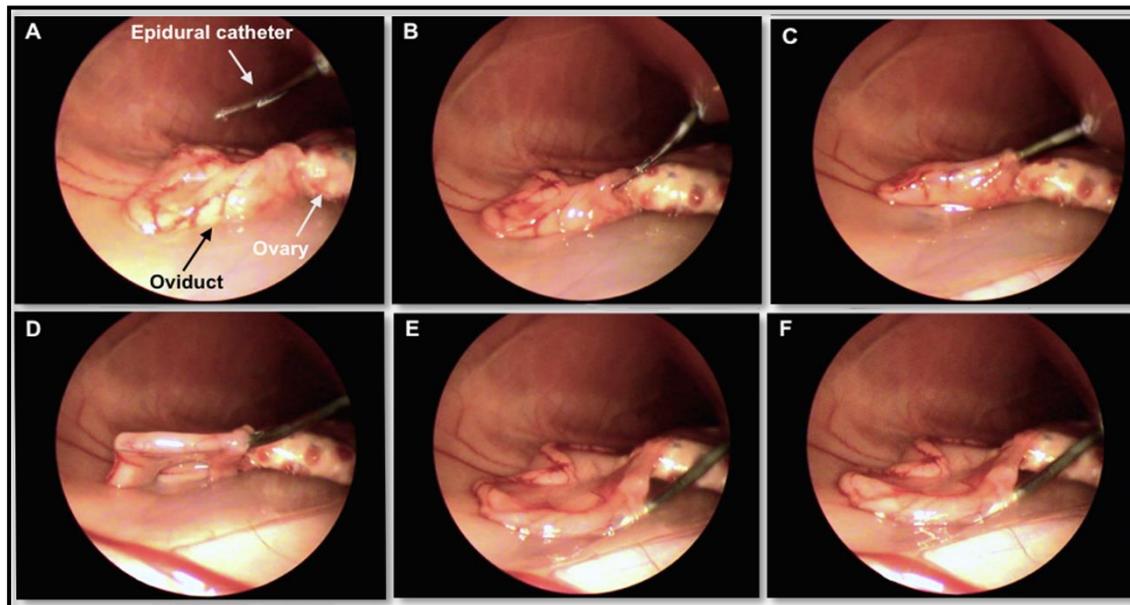


Figura 8. Secuencia de pasos de la transferencia de embriones por laparoscopia. 8.A. Introducción de la aguja epidural en la cavidad abdominal. 8.B. Ubicación del catéter en la entrada del infundíbulo. 8.C y D. Entrada del catéter a unos 2-3 cm dentro del oviducto. 8.E y F. Transferencia de los embriones a través del catéter que pasa por dentro de la aguja epidural.

3.4.6. Ecografías por ultrasonidos

Todas las receptoras fueron sometidas a seguimiento ecográfico tras una semana desde la transferencia. Para ello las hembras fueron colocadas en una caja limpia de polietileno para ser trasladarlas a la sala de ecografías, donde para reducir el estrés fueron sedadas y anestesiadas por vía intramuscular con una dosis sinérgica mínima (5 mg/kg de xilazina + 20 mg/kg de ketamina). Además, se realizó un rasurado del abdomen para reducir la interferencia de los pelos en la ecografía.

El monitoreo se realizó con una frecuencia de 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes) hasta el día 27 de gestación, con un total de 9 ecografías por coneja (10, 12, 14, 17, 19, 21, 23, 25, 27-días de edad embrionaria). El equipo de ultrasonido utilizado fue el My Lab 70 x V6 portátil (Esaote, España) con una sonda lineal de 7.5 MHz (4-12 MHz de rango). La ecografía se realizó de izquierda a derecha con la sonda en orientación sagital, una vez que se localizó las diferentes estructuras identificables (bolsa fetal, feto y las placentas) y cuando apareció la mayor superficie en la pantalla, se realizaron de 2-3 video-grabaciones por cada feto con 7 segundos aproximados de duración. Estos clips fueron posteriormente analizados con el software MyLab_Desk 8.0 build 9.0.159.0.

3.5.-Determinaciones

3.5.1. Etapa de gestación

Trascurrida una semana después de la transferencia se realizó un recuento de los embriones implantados (EI) mediante laparoscopia (figura 9), registrando además el número de embriones en regresión (ER).



Figura 9. Vesículas uterinas hinchadas por la presencia de los embriones implantados.

El crecimiento corporal prenatal se caracterizó a través de las mediciones de la longitud del feto (obtenida de las ecografías) siguiendo el método descrito por Vicente *et al.* (2013). Estas mediciones se ilustran en la figura 10. Las mediciones del feto completo se hicieron eligiendo la opción Tr-Length, con ello trazamos la longitud desde la cabeza hasta la terminación de la grupa (LCG) justo hasta la base de la cola, quedando un contorno en forma de C en un plano sagital.

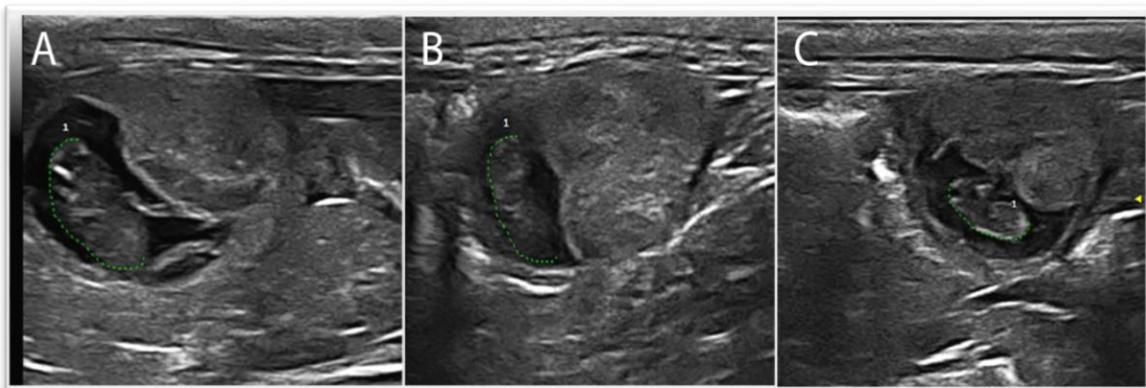


Figura 10. Medidas por ultrasonido de la longitud del feto. A. Feto del genotipo rosa; B. Feto del genotipo amarillo; C. Feto del genotipo verde.

Tras producirse el parto se registró el número total de gazapos nacidos (NT), nacidos vivos (NV) y nacidos muertos (NM).

Las variables (ET, EI y NV) fueron registradas en escala dicotómica, tomando como posibles categorías: 1 (suceso positivo) y 0 (suceso no dado o negativo). Esto permitió expresar cuatro nuevas variables-tasas:

- Supervivencia embrionaria (SE), definida como el cociente entre los embriones implantados (EI) y los embriones transferidos (ET).
- Supervivencia gestacional (SG), definida como el cociente entre individuos nacidos vivos (NV) y los ET.
- Pérdidas fetales (PF), definida como el cociente entre los embriones no nacidos y los embriones implantados (EI).

3.5.2. Etapa de lactación (desde el nacimiento hasta el destete)

Tomamos como referencia la semana cero para el nacimiento y la cuarta semana para el destete (28 días). El día de nacimiento los gazapos fueron pesados individualmente, sexados e identificados mediante un microchip (figura 11). A partir de este momento se controló la supervivencia durante la etapa y el peso corporal (PC) semanal de cada animal, con el cual se determinó la ganancia en peso vivo [GPV= Peso final (PF) - Peso inicial (PI)], para posteriormente obtener la ganancia media diaria [GMD= GPV/Duración de la crianza (DC=28 días)]. La supervivencia de esta etapa también fue registrada en escala dicotómica, quedando expresada en la siguiente tasa:

- Supervivencia en lactación (SPL): definida como el cociente entre gazapos destetados (GD) y los nacidos vivos.



Figura 11. Registros al día de parto. A. Sexado; B. Pesaje; C. Colocación del microchip para identificación individual.

3.5.3. Etapa de engorde (desde el destete hasta el sacrificio)

Esta etapa se enmarcó desde la cuarta semana (destete a día 28) hasta la novena semana (sacrificio a día 63). Durante este período se realizaron pesajes semanales y se controló la supervivencia. Al igual que la etapa de lactación se determinó la GPV, siendo en este caso el peso inicial= peso al destete (PD) y el peso final= peso al sacrificio (PS); calculándose posteriormente la ganancia media diaria [GMD= GPV/Duración de la crianza (DC=35 días)]. La supervivencia en esta etapa al igual que en la lactación, fue registrada en escala dicotómica, quedando expresada en la siguiente tasa:

- Supervivencia en engorde (SPE): definida como el cociente entre gazapos que alcanzan la edad sacrificio (GS) y los gazapos destetados.

3.6. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos incluyeron la totalidad de los datos; inclusive hasta los casos con implantación fallida y muertes de madres al día del parto. Por tanto, no se aplicó ningún criterio de exclusión de datos. Así mismo, todos los caracteres de interés fueron analizados mediante un modelo lineal generalizado (GLM) utilizando el software estadístico IBM SPSS Statistics® para windows, versión 23.0. Después de estudiar la significación de los efectos en los análisis exploratorios, se simplificó el modelo, incluyendo sólo aquellos factores que mostraron un efecto significativo. No se tuvo en cuenta las interacciones, centrando el experimento en el efecto materno (las receptoras quedan jerarquizadas al embrión).

El respectivo uso de los modelos lineales generalizados (GLM) se justifica como una alternativa a la transformación de la variable dependiente/respuesta, y a la falta de normalidad, la heterocedasticidad de la varianza (varianzas no constantes) o la no linealidad de nuestros datos.

No fue posible incluir en el modelo un efecto de grupo o lote, porque el número de hembras por lote era reducido. El efecto año-estación usado en su lugar, tampoco tuvo un efecto significativo al explicar sólo una pequeña parte de la variación en los caracteres medidos. El efecto de orden de parto fue prácticamente irrelevante. El efecto de camada común y el ambiental permanente de la madre, no se incluyeron como factores aleatorios en el modelo porque sólo se controló un parto.

3.6.1. Superovulación

En el tratamiento de superovulación aplicamos una estadística descriptiva, para representar en un diagrama de cajas y bigotes la eficacia del mismo. Las variables analizadas fueron: tasa de ovulación (TO), embriones recuperados (ER), óvulos (OV) y embriones anormales (A). Es de nuestro interés hacer notar que esta salida estadística es meramente descriptiva, pues es la primera vez que este producto hormonal se utiliza en esta especie.

3.6.2. Supervivencia prenatal

Las variables fueron analizadas mediante un GLM de respuesta binaria o dicotómico (vivo-muerto con valores 0/1, respectivamente), utilizando una sola ecuación de regresión (tipo probit link) para representar los grupos. El tipo de modelo fue de efectos principales y sin interacciones:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + TGr_j + b^* CV_k + e_{ijk}$$

En donde los componentes fueron:

- Variable dependiente/respuesta con distribución binomial: $Y_{(SE, SG \text{ y } PF)}$.
- μ : es la media general de las observaciones.
- Variables explícitas o predictoras: Efecto donante (D_i) que recoge el efecto conjunto de la pareja de padres, y el tipo genético de la receptora (TGr_j); ya sea (R, A y V).
- Covarible (CV_k): ET para la SE; EI para la SG y las PF.
- b : es el coeficiente de regresión de la covariable en función.
- e_{ijk} : error del modelo (parte de la observación no explicada por los factores).

3.6.3. Crecimiento prenatal

Para las mediciones obtenidas por ecografías de la longitud del feto durante la gestación, aplicamos un modelo mixto, quedando de la siguiente manera:

$$Y_{ijkl} = \mu + D_i + T_j + TGr_k + b^* EI_l + e_{ijkl}$$

donde:

- y : es el carácter longitud del feto en milímetros.
- μ : es la media general de las observaciones.
- Efecto aleatorio: Efecto donante (D_i).
- Efectos fijos:
 - T_j : es el día concreto de la medición durante la gestación (10, 12, 14, 17, 19, 21, 23, 25 y 27).
 - TGr_k : tipo genético de la receptora (R, A y V).
- Covariable: embriones implantados (EI_l).
- b : coeficiente de regresión de la covariable EI.
- e_{ijkl} : error del modelo.

3.6.4. Supervivencia postnatal

La supervivencia durante la lactación y el engorde la analizamos mediante el mismo modelo que la prenatal. El modelo utilizado en función de la etapa fue el siguiente:

Lactación:

$$Y_{lij} = \mu + D_i + TGr_j + b \cdot NV_k + e_{ijk}$$

Engorde:

$$Y_{eijk} = \mu + D_i + TGr_j + b \cdot GD_k + e_{ijk}$$

donde:

- Y_l : carácter supervivencia en lactación hasta los 28 días.
- Y_e : carácter supervivencia en engorde hasta los 63 días.
- μ : media general de las observaciones.
- D_i : efecto donante.
- TGr_j : tipo genético de la receptora (R, A y V).
- Covariables: NV y GD.
- b : coeficiente de regresión de la covariable NV y/o GD.
- e_{ijk} : error del modelo.

3.6.5. Crecimiento postnatal

El análisis de la ganancia media diaria (GMD) obtenida en la etapa de lactación y engorde, lo realizamos a través de un modelo mixto, quedando la ecuación siguiente según la etapa:

Lactación:

$$Y_{lijk} = \mu + D_i + TGr_j + b \cdot NV_k + e_{ijk}$$

Engorde:

$$Y_{eijk} = \mu + D_i + TGr_j + b \cdot NV_k + e_{ijk}$$

donde:

- Y_l : carácter GMD hasta los 28 días.
- Y_e : carácter GMD hasta los 63 días.
- μ : media general de las observaciones.
- Efecto aleatorio: efecto donante (D_i).
- Efecto fijo (TGr_j): tipo genético de la receptora (R, A y V).
- b : coeficiente de regresión de la covariable NV.
- e_{ijk} : error asociado.

4.-RESULTADOS

4.1. Superovulación

Las conejas utilizadas como donantes de embriones (genotipo R) fueron todas nulíparas con un peso medio de 5.1 ± 0.6 kg y una edad alrededor de 5 meses. Los resultados de la aplicación del tratamiento superovulatorio con Elonva® ($0.75 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo) mostraron que, de un total de 39 conejas sometidas al tratamiento, 34 (87.2%) ovularon, mientras que 5 (12.8%) no respondieron a dicho tratamiento. No obstante, únicamente 13 (33.3%) de las hembras fueron utilizadas como donantes de embriones, ya que presentaban un mínimo de 21 embriones transferibles. Estas produjeron una media de 31.7 ± 2.4 embriones transferibles, lo que permitió obtener un total de 453 embriones catalogados como “aptos para su transferencia”, que fueron distribuidos entre los 3 genotipos estudiados (151 embriones), transfiriendo entre 7-14 embriones por animal. En la figura 12 se muestran más detalles sobre los resultados del tratamiento de superovulación.

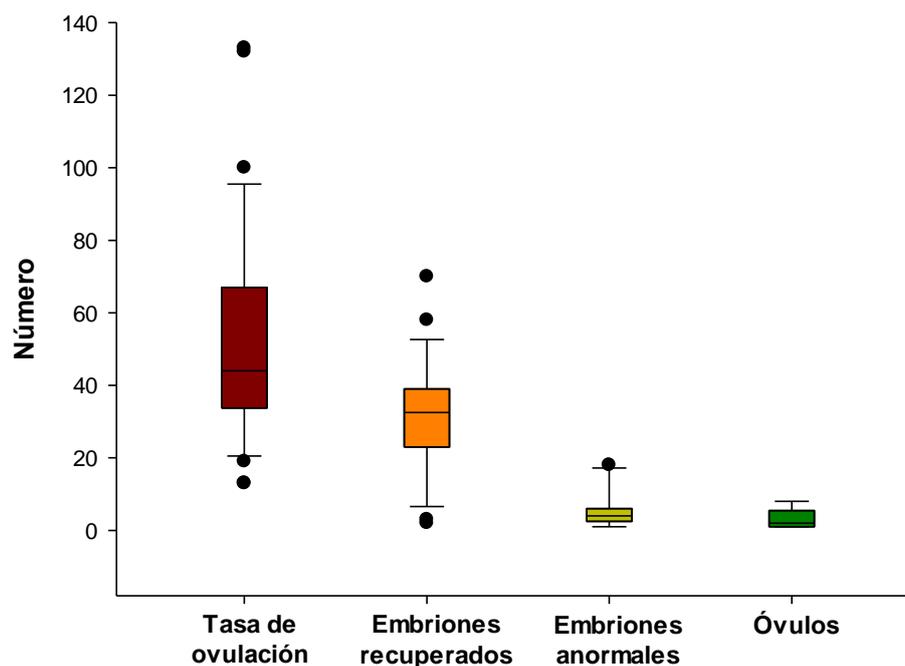


Figura 12. Representación del diagrama de cajas y bigotes para la eficacia del tratamiento de superovulación con Elonva® (corifolitropina alfa). En cada cuadro se representa el cuartil más bajo (25%-Q1), la mediana (50%-Q2) y el cuartil mayor (75%-Q3), mientras que las barras de error representan el mínimo y máximo de las observaciones, y los círculos negros los valores atípicos o extremos.

Tal y como se observa en la figura 12, existe una gran variabilidad en la respuesta hormonal con una marcada dispersión y asimetría de los datos. Como ejemplo, tanto la tasa de ovulación, como los embriones recuperados presentan valores atípicos.

Concretamente la tasa de ovulación varió entre 13 y 133, mientras que los embriones recuperados oscilaron entre 2 y 70. En cuanto al número de óvulos y embriones anormales producidos, estos oscilaron entre 1-18 óvulos y entre 1-8 embriones catalogados como anormales.

4.2. Supervivencia prenatal y pérdidas fetales

Los resultados de la supervivencia prenatal, así como de las pérdidas fetales se muestran en la figura 13. En concreto, el genotipo paternal R presentó la menor tasa de supervivencia embrionaria en comparación con ambos genotipos maternos (A y V), siendo el comportamiento de ambos genotipos maternos similar. Sin embargo, en términos de supervivencia gestacional y pérdidas fetales todos los genotipos se comportaron de manera similar.

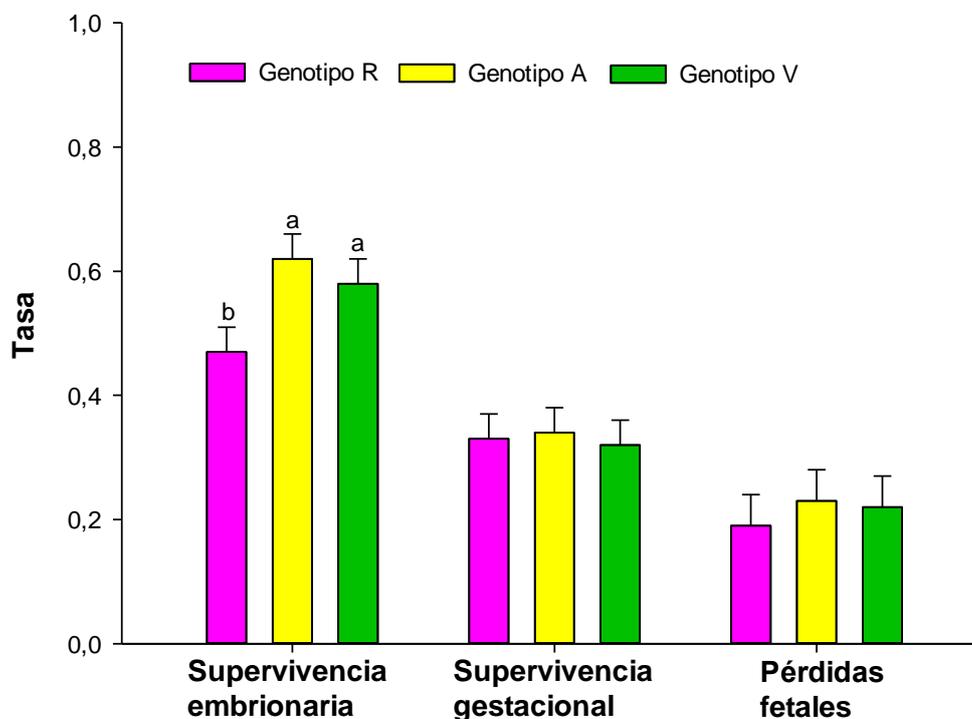


Figura 13. Valores medios de las tasas de supervivencia embrionaria y gestacional; así como de las pérdidas fetales según el tipo de influencia materna. Las barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). La covariable que aparece en el modelo se evalúa en el valor siguiente: EI = 6.76 con un $b = 0.05 \pm 0.012$ tasa/SG y con un $b = -0.05 \pm 0.012 \pm 0.014$ tasa/PF; respectivamente ($p < 0.05$). Genotipo R: Línea seleccionada por velocidad de crecimiento. Genotipo A: Línea seleccionada por un índice familiar. Genotipo V: Línea sintética seleccionada por metodología BLUP.

La tasa de supervivencia embrionaria determinada a día 10 de gestación mediante laparoscopia fue de un 0.47 ± 0.04 vs 0.62 ± 0.04 y 0.58 ± 0.04 para el genotipo R vs genotipo A y genotipo V, respectivamente. Ambos genotipos maternos presentaron un mayor porcentaje de embriones implantados, superando al genotipo paterno en

más de un 10%. En cuanto a la supervivencia gestacional determinada a parto, esta fue de un 0.33 ± 0.04 vs 0.34 ± 0.04 y 0.32 ± 0.04 para el genotipo R, genotipo A y genotipo V, respectivamente. Mientras que las pérdidas fetales fueron de 0.19 ± 0.05 vs 0.23 ± 0.05 y 0.22 ± 0.05 ; respectivamente para los genotipos R, A y V.

4.3. Crecimiento prenatal

El resultado obtenido del estudio del efecto del genotipo materno sobre el crecimiento prenatal (determinado mediante la longitud del feto) se muestra en la figura 14. Los resultados revelan que desde el día 10 (primera determinación) hasta el día 19 no hay ningún efecto maternal sobre la longitud del feto. Sin embargo, el día 21 se produce un incremento diferencial de la longitud del feto, siendo este mayor en los embriones desarrollados en un ambiente uterino del genotipo paternal R, manteniéndose esta diferencia más o menos constante hasta el final de la gestación. Destacar que, durante toda la gestación, los embriones desarrollados en un genotipo maternal (A y V) presentaron una longitud del feto similar.

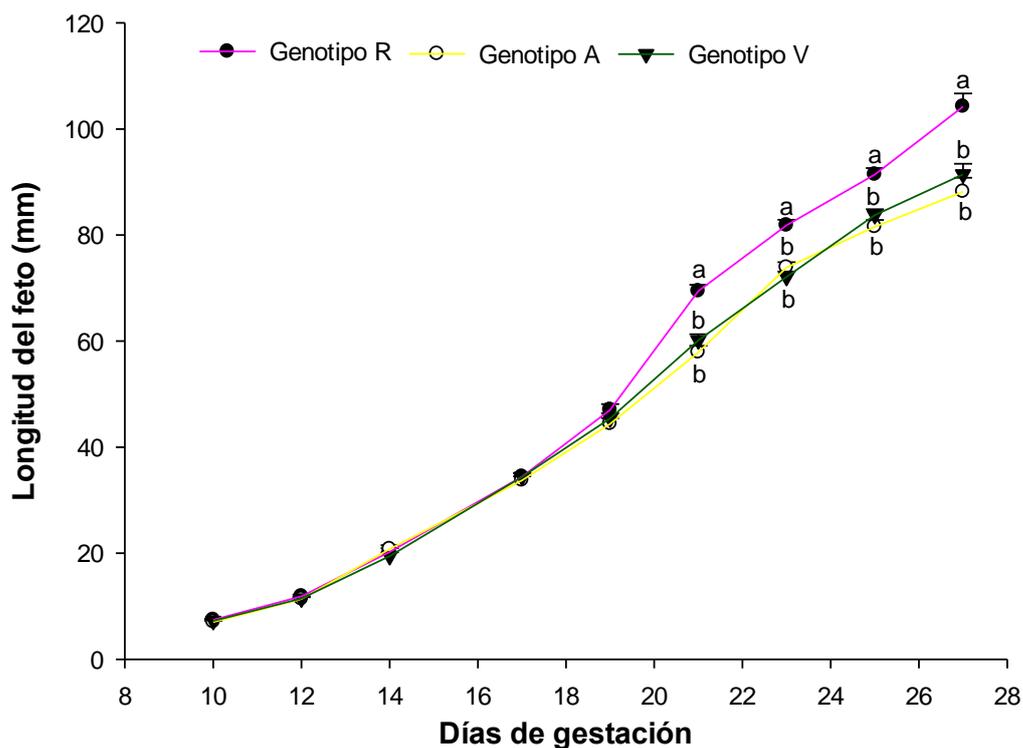


Figura 14. Media \pm S.E. para la medición de la longitud del feto, realizada durante la gestación y acorde al día concreto de la medición según el genotipo materno. Días con letras diferentes en sentido vertical indican una diferencia estadística significativa entre tipos ($p < 0.05$). La covariable que aparece en el modelo se evalúa en el valor siguiente: $EI = 8.2$ con un b entre -0.1 ± 0.1 mm/EI y -0.2 ± 0.3 mm/EI; respectivamente para el rango de días de las mediciones ($p < 0.05$). Genotipo R: Línea seleccionada por velocidad de crecimiento. Genotipo A: Línea seleccionada por un índice familiar. Genotipo V: Línea sintética seleccionada por metodología BLUP.

4.4. Tamaño de camada y peso a nacimiento

El efecto del genotipo materno sobre el tamaño de camada y peso a nacimiento se muestra en la tabla 1. Desde un punto de vista del rendimiento global del procedimiento, determinando el tamaño de camada en función del número de embriones transferidos, no hay diferencias entre los 3 genotipos en número de nacidos totales y nacidos vivos.

Tabla 1. Efecto del genotipo materno sobre el tamaño de camada y peso al nacimiento.

Genotipo	Rendimiento global [#]			Rendimiento al parto [*]			
	N _r	NT	NV	N _p	NT	NV	PN
R	13	4.5±0.9	2.9±0.8	10	5.5±0.5	3.8±0.8	72.7±2.2 ^a
A	13	4.8±0.9	3.9±0.8	10	5.6±0.5	4.4±0.8	67.0±2.1 ^b
V	13	5.4±0.9	3.9±0.9	11	6.1±0.5	4.5±0.8	61.7±2.0 ^b

Valores medios ± S.E. para el [#]Rendimiento calculado en base al número de embriones transferidos(RG). ^{*}Rendimiento calculado en base al número de hembras con parto de las que implantaron(RP). N_r: Número de receptoras empleadas. NT: gazapos nacidos totales. NV: gazapos nacidos vivos. N_p: Número de hembras que parieron. PN: Peso al nacimiento expresado en gramos. La covariable que aparece en el modelo se evalúa en el valor siguiente: ET = 11.6 con un b = 1.4 ± 0.6 tasa/NT y con un b = 0.5 ± 0.8 tasa/NV; respectivamente para para el RG, y con EI = 7.2 con un b = 0.9 ± 0.1 tasa/NT, con un b = 0.6 ± 0.2 tasa/NV y con un b = -0.2 ± 0.1 g/gazapo; respectivamente para para el RP y PN. Genotipo R: Línea seleccionada por velocidad de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (p<0.05). Genotipo A: Línea seleccionada por un índice familiar. Genotipo V: Línea sintética seleccionada por metodología BLUP.

Sin embargo, de las 39 hembras a las que se transfirieron embriones, 31 (79.5%) generaron descendencia, siendo la distribución entre genotipos similar (10 para genotipo R, 10 para genotipo A y 11 para genotipo V). Cuando se compararon los tamaños de camada al parto, no se observaron diferencias significativas entre los genotipos uterinos.

Destacar que cuando el peso medio de los gazapos fue determinado a parto, si se encontró influencia del genotipo materno sobre este, siendo el peso medio del genotipo R superior al de ambos maternas (A y V), los que tuvieron un valor medio similar.

4.5. Supervivencia posnatal

El efecto del genotipo materno sobre la supervivencia durante la etapa de lactación y engorde se muestran en la figura 15. Destacar que no se ha observado ningún efecto del genotipo materno durante el post-parto sobre la supervivencia posnatal.

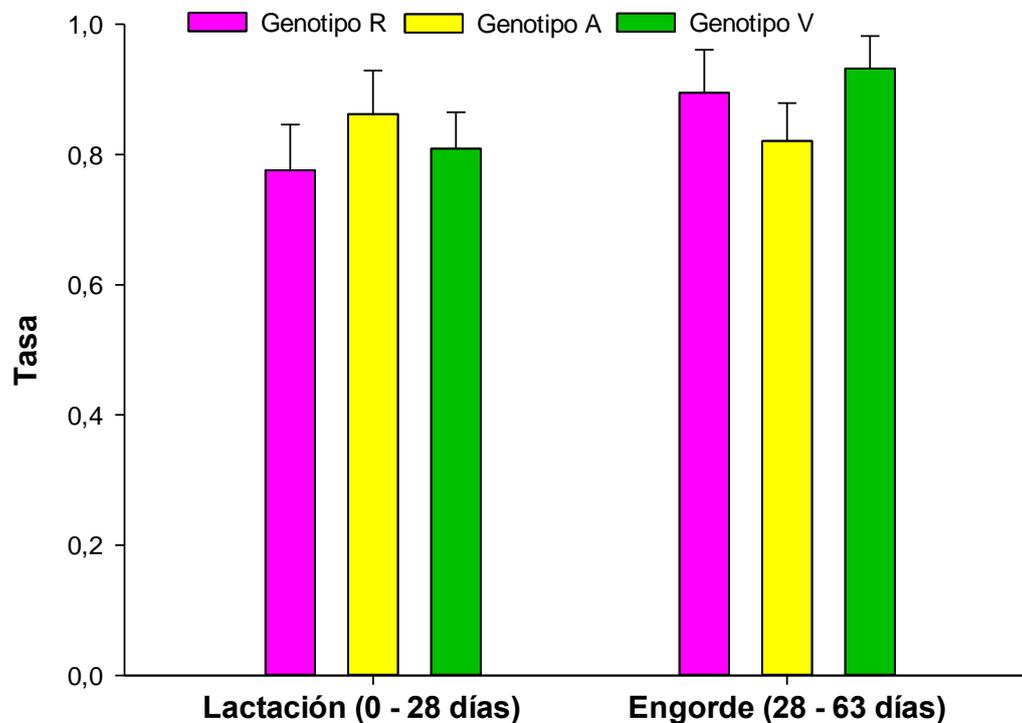


Figura 15. Media \pm S.E. para la supervivencia de los gazapos desde el nacimiento hasta el sacrificio. Estos resultados son referidos a las etapas de lactación y engorde, sin apreciarse diferencias significativas ($p > 0.05$). La covariable que aparece en el modelo se evalúa en el valor siguiente: NV = 6.51 con un $b = 0.011 \pm 0.016$ tasa/NVD y 6.55 con un $b = -0.022 \pm 0.014$ tasa/NVE; respectivamente para la etapa de lactación y engorde ($p < 0.05$). Genotipo R: Línea seleccionada por velocidad de crecimiento. Genotipo A: Línea seleccionada por un índice familiar. Genotipo V: Línea sintética seleccionada por metodología BLUP.

4.6. Crecimiento postnatal

El estudio del crecimiento postnatal se realizó en base a la ganancia media diaria (GMD) diferenciando la etapa de lactación y engorde (figura 16). Durante la lactación se observó un efecto significativo entre el genotipo R con respecto a ambos genotipos maternos (A y V). El genotipo R presentó un mayor valor medio de GMD (21.1 ± 0.9 g/d), mientras que ambos genotipos maternos presentaron una GMD similar (18.7 ± 0.8 g/d y 18.3 ± 0.7 g/d; respectivamente para el genotipo A y V).

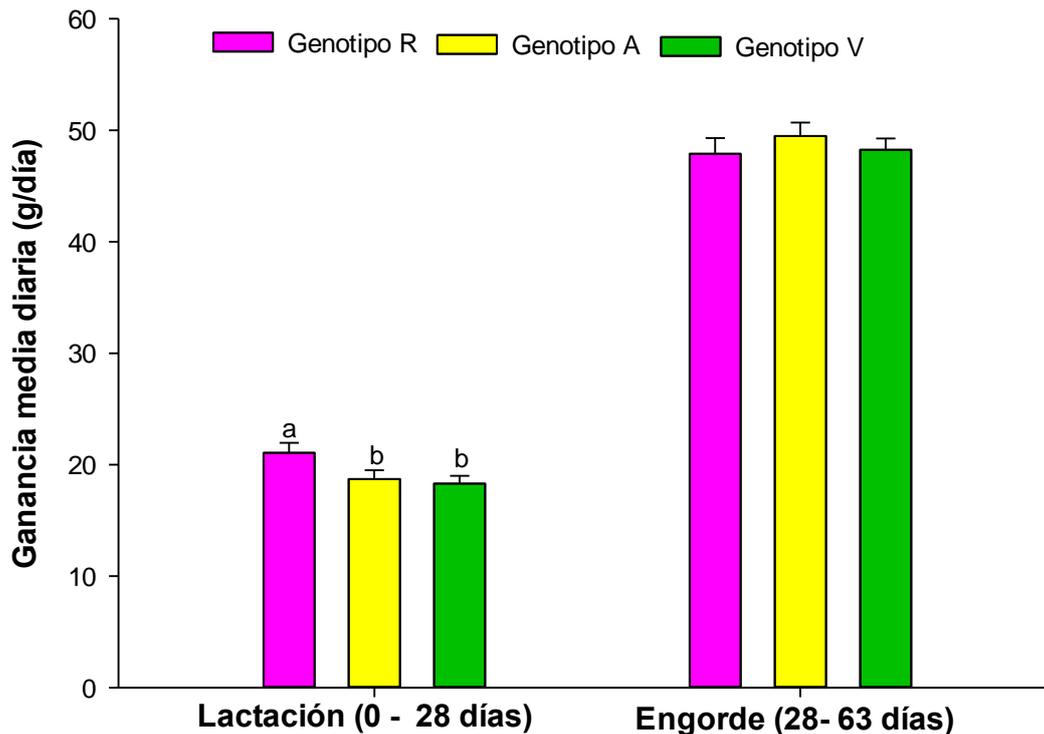


Figura 16. Media \pm S.E. para la determinación de la GMD según el tipo de efecto materno, realizada durante las etapas de lactación y engorde. Valores con letras diferentes en sentido horizontal y según etapa, indican una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). La covariable que aparece en el modelo se evalúa en el valor siguiente: NV = 6.6 con un $b = -1.1 \pm 0.2$ g/d y 6.3 con un $b = -0.9 \pm 0.3$ g/d; respectivamente para la etapa de lactación y engorde ($p < 0.05$). Genotipo R: Línea seleccionada por velocidad de crecimiento. Genotipo A: Línea seleccionada por un índice familiar. Genotipo V: Línea sintética seleccionada por metodología BLUP.

El análisis durante la etapa de engorde reveló que el efecto materno no fue significativo sobre la GMD de los gazapos desarrollados en los tres ambientes uterinos. Por tanto, el valor medio de la GMD del genotipo R fue similar a la de ambos genotipos maternos (47.9 ± 1.4 g/d vs 49.5 ± 1.2 g/d y 48.3 ± 1.0 g/d; respectivamente para los genotipos R, A y V).

5.-DISCUSIÓN

Es conocido que factores genéticos y ambientales regulan la supervivencia prenatal (Santacreu, 2006), y que estos además afectan al desarrollo de los tejidos en el feto y como la interacción de ambos factores son importantes en la determinación del fenotipo de la descendencia (Brameld *et al.*, 2009). En este genotipo, nuestros resultados demuestran la existencia del efecto del genotipo materno sobre la supervivencia embrionaria, el crecimiento prenatal y durante la etapa de lactación.

La supervivencia prenatal se ve alterada por factores genéticos y ambientales que influyen sobre el desarrollo embrionario a través del ambiente materno durante la fecundación, el desarrollo embrionario preimplantacional, la placenta y el feto, o por un efecto sobre la relación embrión-endometrio (Wilmut *et al.*, 1986). Nuestros resultados muestran a día 10 de gestación (post-implantación en conejo) como la supervivencia prenatal está influenciada por el genotipo materno, datos acordes con resultados anteriores (Bradford, 1978; Cowley *et al.*, 1989 en ratón; Kaminski *et al.*, 1996 en cerdo; Mocé *et al.*, 2004 en conejo). Sin embargo, la influencia del genotipo materno y del genotipo embrionario en la supervivencia prenatal no parece estar del todo clara (Vicente *et al.*, 2013). Son varios estudios los que han demostrado que la supervivencia prenatal está únicamente regulada por el genotipo embrionario (Youngs *et al.*, 1994; Ernst *et al.*, 2000, en ratón; Ashworth *et al.*, 1990; Kaminski *et al.*, 1996, en cerdos). Sin embargo, en conejos Vicente *et al.* (2013) demostraron que ambos, “genotipo embrionario y genotipo materno” influyen sobre esta. Una cuestión importante a la hora de comparar todos estos estudios es que los protocolos difieren notablemente, como por ejemplo en la especie utilizada (ratón, cerdo, conejo), la raza o línea, el procedimiento de transferencia de embriones (quirúrgico vs no quirúrgico), lo que podría explicar en medida estas discrepancias observadas.

En nuestro estudio, para intentar separar los efectos del genotipo materno y el genotipo embrionario, hemos desarrollado un modelo de transferencia de embriones con un único genotipo embrionario sobre varios genotipos maternos. En estudios previos en conejo, la transferencia recíproca de embriones entre líneas o razas ha sido comúnmente empleada para separar los diferentes efectos (Santacreu, 2006; Vicente *et al.*, 2013; Naturil-Alfonso *et al.*, 2015). Sin embargo, un limitante de estos estudios es que sólo permiten la comparación entre dos ambientes. En este estudio a diferencia de los anteriores se ha aleatorizado el efecto embrionario, centrando todo el efecto en el ambiente materno (la hembra está jerarquizada al embrión). No obstante, nuestro

procedimiento implica el uso de un tratamiento de superovulación, y estudios previos han demostrado una marcada variabilidad de la calidad embrionaria (Boland *et al.*, 1991; Viudes-de-Castro *et al.*, 2009). Dentro de los factores que contribuyen a esta variabilidad se encuentran la donante, raza, edad, el estado reproductivo, el origen de la hormona folículo-estimulante y el ratio de las preparaciones de las gonadotropinas (Lerner *et al.*, 1986; Kafi & McGowan, 1997). Además, estos tratamientos han sido relacionados con un aumento de la mortalidad prenatal debido a un incremento de la tasa de ovulación (Koenig *et al.*, 1986), la variabilidad en el desarrollo embrionario por un incremento del tiempo del proceso de la ovulación (Fujimoto, 1974) y una mayor competencia entre los embriones y/o fetos por el espacio y los nutrientes al aumentar el número de embriones (Geisert & Schmitt, 2002). Badawy & Santacreu (2013) en conejos observaron una menor supervivencia embrionaria y fetal (desde la implantación hasta el día 18 de gestación), resultados similares a los observados en porcino (van der Waaij *et al.*, 2010). En nuestro estudio, empleamos un tratamiento de FSH recombinante de acción prolongada mediante corifolitropina alfa (Elonva®) como un método simplificado ya que éste únicamente se administra en una sólo inyección. Desafortunadamente, nuestros resultados no son comparables con trabajos previos ya que, bajo nuestro conocimiento, el uso de éste principio activo no ha sido descrito hasta la fecha en conejo. Si bien, tan sólo el 33% de las hembras (n=13) sometidas al tratamiento fueron seleccionadas como donantes por presentar un mínimo de 21 embriones con una buena calidad en base a los criterios morfológicos de Jainudeen *et al.* (1996). Estos resultados están en cierta forma condicionados por el genotipo de la línea R. Este genotipo presenta, como características principales, una alta velocidad de crecimiento en comparación con los genotipos de las líneas maternas (50-55 g/d), una buena eficiencia de la alimentación (2.1) y un alto peso adulto. Sin embargo, también se caracteriza por peculiaridades desde el punto de vista reproductivo, como es un tamaño de la camada a nacimiento y destete de alrededor de 7 y 6 respectivamente (Feki *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 1999), un elevado porcentaje de fallos en la inducción de la ovulación post-coital (45%) debido a una baja concentración de LH (Naturil-Alfonso *et al.*, 2016), una baja tasa de implantación y un porcentaje muy elevado de pérdidas fetales y gestacionales (Vicente *et al.*, 2012; 2013). No obstante, si nos basamos en los resultados obtenidos en términos de implantación y de individuos nacidos a parto, los resultados obtenidos son ligeramente inferiores a los observados en estudios anteriores empleando transferencia recíproca de embriones entre hembras de líneas R y A (Vicente *et al.*, 2013; Naturil-Alfonso *et al.*, 2015). La principal diferencia entre este diseño experimental y los anteriores, es el uso de hembras múltiparas como receptoras, lo que podría explicar en parte estas

diferencias. Es conocido que las gestaciones con embriones transferidos son menores en animales múltiparos (Ferraz *et al.*, 2016). Por ello, consideramos que el modelo de superovulación empleado parece idóneo para el objetivo de este estudio. En cuanto al procedimiento de transferencia embrionaria por laparoscopia éste es poco invasivo y se ha demostrado que no afecta a la supervivencia prenatal (Mocé *et al.*, 2004; Naturil-Alfonso *et al.*, 2015). Además, destacar que el modelo conejo, especie de ovulación inducida, hace que sea particularmente adecuada para este tipo de estudios (Moody & McNitt, 1988; Fischer *et al.*, 2012).

Retomando nuestros resultados, se observa una influencia del genotipo materno en la supervivencia embrionaria (desde la transferencia hasta la implantación), ya que los genotipos seleccionados por caracteres maternos como son la línea A y V (tamaño de camada al destete) presentan un incremento en supervivencia embrionaria frente al genotipo de la línea R (seleccionada por velocidad de crecimiento). Estos resultados son diferentes a los mostrados por Vicente *et al.* (2013), quienes obtuvieron la misma tasa de implantación en la línea A y línea R cuando embriones de genotipo R fueron transferidos. No obstante, varios autores han sugerido que el genotipo embrionario puede tener un efecto en la supervivencia fetal cuando hay un genotipo materno favorable (Moler *et al.*, 1980; Mocé *et al.*, 2004). Acorde al criterio de selección de las líneas maternas, parecería lógico pensar que éstas líneas podrían favorecer la supervivencia embrionaria, tal y como se desprende de nuestros resultados. Sin embargo, este efecto se pierde cuando se analizan los resultados de la supervivencia gestacional y el tamaño de camada, ya que estos fueron similares para todos los genotipos. Estos resultados van en la línea de lo descrito por Vicente *et al.* (2013) para la línea R, donde las pérdidas gestacionales alcanzan una cifra alrededor del 50%. El tamaño de camada observado en este genotipo es similar al tamaño medio de camada de la línea R bajo condiciones normales de reproducción, pero muy inferior al de la línea A (6.4 ± 0.4 y 10.6 ± 0.4 para la línea R y A, respectivamente, Vicente *et al.*, 2012). En estudios previos, se ha dado como posible explicación a las elevadas pérdidas que presenta la línea R las deficiencias en la interacción del embrión con el útero como consecuencia de unos niveles bajos de receptores de IGF-II en los embriones de genotipo R (Llobat *et al.*, (2012). En cuanto a las pérdidas fetales, no observamos diferencias entre los genotipos maternos, siendo esto similar a los datos de estudios previos en conejo (Adams, 1960; Blasco *et al.*, 1994).

Acorde con Symeon *et al.* (2015) la gestación en el conejo se divide en 3 etapas: (i) período entre la fecundación y la implantación, (ii) el período de organogénesis y (iii) el período de crecimiento fetal (fotogénesis). La implantación tiene lugar 6-7 días después de la fecundación. El período de la organogénesis se da entre los días 7 y 18-19 (más o menos el segundo tercio del período de gestación de 30 días) y el crecimiento fetal desde el 19-30, siendo este muy rápido (Anderson & Henck, 1994). Cuando el efecto del genotipo materno fue estudiado en base al crecimiento fetal (longitud del feto) mediante examen ecográfico, nuestros resultados indican que desde el día 10 hasta el día 19 de gestación no hay diferencias entre genotipos maternos. Sin embargo, a partir del día 19 hasta el día 21 se observa un incremento significativo de la longitud de los fetos en el genotipo R. En conejo, se ha establecido que aproximadamente a día 19.5 se ha completado la apariencia fetal, finalizándose la organogénesis (Beaudoin *et al.*, 2003), dándose un crecimiento muy rápido desde este momento hasta finalizar la gestación (Symeon *et al.*, 2015). Destacar que esta variación a favor del genotipo materno de la línea R observada a día 21 se mantiene más o menos constante hasta el final de la gestación (entre un 15.4% y 16.6% mayor). Las longitudes del feto obtenidas durante toda la gestación están acorde con los estudios previos realizados en conejos (Rinck *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994; Chavatte-Palmer *et al.*, 2008; Vicente *et al.*, 2013) y más concretamente con mediciones ya descritas para la línea R (Naturil-Alfonso *et al.*, 2016). Además, de forma conjunta, los gazapos desarrollados en el genotipo de la línea R presentan un mayor peso a nacimiento. Resultados que van en la línea de lo mostrado por Chavatte-Palmer *et al.* (2008) quienes demostraron la relación entre la longitud y el peso del feto. Por tanto, estos resultados demuestran una “incapacidad” por parte de los gazapos para alcanzar su máximo potencial genético de crecimiento, como consecuencia del efecto materno durante el período gestacional. Algo similar ha sido previamente descrito cuando se han realizado experimentos de restricción del crecimiento fetal tanto en condiciones naturales como artificiales (Swanson & David, 2015). Actualmente, cada vez es más evidente que el desarrollo embrionario se ve influenciado por los efectos maternos heredados a través de la maduración citoplasmática, la edad materna y el tamaño del cuerpo materno (Cowley, 1991a; 1991b). Estos efectos maternos son clasificados a menudo como factores epigenéticos, ya que condicionan la expresión génica de la descendencia y por lo tanto alteran la relación entre el genotipo y el fenotipo (Cowley *et al.*, 1989; Atchley & Hall, 1991; Atchley *et al.*, 1991). En los últimos años se ha producido un incremento notable de las publicaciones sobre la hipótesis del “origen fetal” (Barker, 1992). Esta hipótesis plantea que los efectos reflejan mecanismos biológicos específicos, y por tanto en la

"programación" fetal, esto se produce posiblemente a través de los efectos del ambiente materno sobre el epigenoma (Almond & Currie, 2011). Cada vez parece más significativo el período en que el feto está en el útero, ya que éste puede ser particularmente importante para el establecimiento de estos "interruptores" (Petronis, 2010). Los eventos adversos que los embriones o fetos pueden experimentar en el útero pueden aumentar la mortalidad fetal, así como las tasas de mortalidad durante los primeros años de vida, pero también pueden dejar marcas en los individuos que sobreviven (Almond & Currie, 2011). Quizás, esto es lo que podría estar ocurriendo con los embriones de genotipo R desarrollados en las líneas A y V. Nuestros resultados sugieren que los embriones y fetos fuera de su ambiente uterino no son capaces de alcanzar su máximo potencial genético de crecimiento, fenómeno conocido como "restricción del crecimiento fetal" (Swanson & David, 2015). La causa principal de esta "restricción del crecimiento fetal", cuando no es atribuible a defectos estructurales o genéticos del feto, es como consecuencia de la insuficiencia placentaria. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios basados en la "restricción del crecimiento fetal" han sido desarrollados bajo condiciones más extremas tales como, ligadura de la arteria uterina en ratas, cobayas y ovejas (Wigglesworth, 1974; Carter, 1993), la inducción de una embolia de la arteria uterina en ovino (Turner & Trudinger, 2009) o una alteración en la placenta (Constancia *et al.*, 2002). Bajo estas condiciones, el feto es incapaz de adquirir los nutrientes y el oxígeno adecuado para cubrir sus necesidades, influenciado por factores maternos que alteran el flujo sanguíneo del feto, el transporte de nutrientes o cambios en la placenta como el aumento de espesor de la barrera la inhibición de la transferencia de nutrientes (Swanson & David, 2015). El resultado son fetos más pequeños con asimétrica en el crecimiento (Woodall *et al.*, 1999; Eixarch *et al.*, 2011). Bajo nuestras condiciones experimentales, el efecto materno no sólo influye sobre la supervivencia embrionaria, sino que también afecta significativamente el crecimiento prenatal y el peso al nacimiento.

Es importante señalar, que el genotipo embrionario empleado se caracteriza por su selección durante 25 generaciones por ganancia media diaria (GMD) entre los 28 y 63 días de edad (Estany *et al.*, 1992). Por ello, el efecto del genotipo materno fue estudiado sobre el fenotipo, tanto en la etapa de lactación (0-28 días) como en la etapa de engorde (28-36 días). Durante el período de lactación, los embriones trasferidos y desarrollados en un genotipo materno de la línea R (coetáneo), en línea con el crecimiento fetal, se mostró superior en 2.6 g/d frente a los desarrollados en los genotipos maternos A y V. Es conocido que durante esta etapa el efecto maternal

sobre los caracteres de crecimiento está presente, mientras que estos son mínimos entre el período de destete y sacrificio (Mínguez-Balaguer, 2012).

Poigner *et al.* (2010) observaron que el tamaño de la camada y el peso al nacer, ejercen en conjunto un marcado efecto sobre la GMD durante la lactación. Como los tamaños de camada obtenidos en nuestro estudio no presentaron diferencias entre ninguno de los genotipos maternos estudiados, nuestros resultados vendrían dados como consecuencia del mayor peso al nacimiento obtenido para los embriones desarrollados en el genotipo de la línea R. Es conocido que durante el período de transición a los alimentos sólidos (entre 3 y 6 semanas), la leche materna todavía tiene un importante papel nutricional (Piattoni *et al.*, 1999). Sin embargo, de acuerdo con nuestro sistema de manejo al realizar el destete a 28 días, los gazapos son separados de la madre y la GMD se asume como independiente del tamaño de la camada. Acorde con esto, una vez finalizada esta etapa, durante engorde los animales son llevados a jaulas colectivas (8 gazapos) con una alimentación *ad libitum* para que exploten su máximo potencial genético de crecimiento. Nuestros resultados revelaron que durante la etapa de engorde no se observó ningún efecto materno sobre la GMD. Concretamente, a partir de la séptima semana se observó un efecto compensatorio de los gazapos desarrollados en los genotipos de la línea A y V, siendo el peso medio de todos los gazapos similar (1648.6 ± 60.34 g para el genotipo R, 1545.3 ± 53.55 g para genotipo A y 1575.1 ± 45.91 g para el genotipo V, datos no mostrados). Este crecimiento compensatorio, en medida gracias a una mayor eficiencia de la alimentación ha sido previamente descrito en conejo a partir de la séptima semana (Gidenne *et al.*, 2009), resultados acorde a los obtenidos en este estudio. Con ello, el peso medio de los gazapos a los 63 días (edad de sacrificio) fuese similar entre todos los genotipos, con un valor medio de 2468.7 ± 77.63 g (datos no mostrados). Ledin (1984) estableció en conejo el límite de compensación del crecimiento en un 20% de diferencia de peso, cifra que esté acorde con nuestros resultados ya la diferencia de peso de los gazapos del genotipo R y de los genotipos A y V al final de la lactación era inferior al 20%.

En cuanto a la supervivencia postnatal, encontramos que independientemente del tipo de genotipo materno durante las etapas de lactación y engorde todos los ambientes maternos presentaron un comportamiento similar, oscilando los valores entre un 78% y 86% durante la lactación y entre un 80% y 92% durante el engorde, datos acorde con los descritos en conejo (Gonzalez & Caravac, 2013), y específicamente para los genotipos utilizados en este estudio (Pérez, 2015). Destacar que, dentro de la mortalidad observada durante la lactación, un 5.4% fue atribuida a gazapos que

pesaron menos de 35 g al nacimiento durante la primera semana de vida, siendo el restante 12.6% de la mortalidad de esta etapa debido a otras causas no determinadas. Este comportamiento de la mortalidad en relación al peso al nacimiento cuando este es inferior 35 g, está acorde con lo descrito por Vicente *et al.* (1995) quienes observaron que los gazapos que no alcanzaban el peso mínimo de 35 g morían durante la primera semana de lactación. De los datos recogidos de la mortalidad durante el engorde hemos encontrado que las dos primeras semanas después del destete, estos alcanzaron unos valores de un 5.9%, mientras que en los restantes 21 días se produce el otro 8.1%. Es conocido que el paso de la alimentación láctea a la sólida aumenta la incidencia de trastornos digestivos, y como consecuencia el índice de mortalidad (Quevedo *et al.*, 2003). En cuanto a la influencia del genotipo materno sobre la supervivencia postnatal, ésta se considera prácticamente irrelevante ya que ésta se ve más afectada por los efectos ambientales (García *et al.*, 1982).

6.-CONCLUSIONES

A partir de los objetivos propuestos y en base a nuestros resultados podemos concluir que:

- Existe una influencia del efecto materno en la supervivencia prenatal, observando este efecto sobre la supervivencia embrionaria, pero no sobre la supervivencia gestacional.
- Existe un efecto materno sobre el crecimiento prenatal, produciendo modificaciones en el crecimiento fetal.
- No se observó un efecto materno sobre la supervivencia postnatal desde la lactación hasta el engorde.
- Existe un efecto materno sobre el crecimiento postnatal durante la etapa de lactación, pero no en la etapa de engorde.

7.-BIBLIOGRAFÍA

- Adams, C. (1960). Prenatal mortality in the rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *Journal of Reproduction and Fertility*. Retrieved from <http://www.reproduction-online.org/content/1/1/36.short>
- Agarwal, S., Vogel, K., Weitsman, S., & Magoffin, D. A. (1999). Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *84*(3), 1072–1076.
- Allen, P., Brambell, F. W. R., & Mills, I. H. (1947). Studies on sterility and prenatal mortality in wild rabbits; the reliability of estimates of prenatal mortality based on counts of corpora lutea, implantation sites and embryos. *The Journal of Experimental Biology*, *23*(3-4), 312–31.
- Almond, D., & Currie, J. (2011). Killing me softly: The fetal origins hypothesis. *The Journal of Economic Perspectives*. Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/aeal/jep/2011/00000025/00000003/art00008>
- Anderson, J., & Henck, J. (1994). The Biology of the Laboratory Rabbit. In *The Biology of the Laboratory Rabbit*. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-469235-0.50001-4>
- Argente, M., Santacreu, M., Climent, A., & Blasco, A. (1999). Phenotypic and genetic parameters of birth weight and weaning weight of rabbits born from unilaterally ovariectomized and intact does. *Livestock Production* Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301622698001663>
- Argente, M., Santacreu, M., Climent, A., & Blasco, A. (2008). Effects of intrauterine crowding on available uterine space per fetus in rabbits. *Livestock Science*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141307003484>
- Ashworth, C., & Haley, C. (1990). Embryo survival and conceptus growth after reciprocal embryo transfer between Chinese Meishan and Landrace Large White gilts. *Journal of Reproduction* Retrieved from <http://www.reproduction-online.org/content/90/2/595.short>
- Atchley, W., & Hall, B. (1991). A model for development and evolution of complex morphological structures. *Biological Reviews*. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-185X.1991.tb01138.x/full>
- Atchley, W., Logsdon, T., Cowley, D., & Eisen, E. (1991). Uterine effects, epigenetics, and postnatal skeletal development in the mouse. *Evolution*. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2409697>
- Badawy, A., Peiró, R., & Santacreu, M. (2013). Efecto de la superovulación sobre la supervivencia embrionaria y fetal en conejas multíparas. *Researchgate.net*. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Ahmed_Badawy19/publication/271386470_Efecto_de_la_Superovulacin_Sobre_la_Supervivencia_Embrionaria_y_Fetal_en_Conejas_Multparas/links/54c6c3400cf22d626a358321.pdf
- Baldassarre, H. (2007). Reproducción asistida en la especie caprina: inseminación artificial a clonación. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Retrieved from <https://cbra.websiteseuro.com/pages/publicacoes/rbra/download/274.pdf>
- Barker, D. (1992). fetal origins of diseases of old age. *European Journal of Clinical*

- Nutrition*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301765683>
- Barker, D. (1995). Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ: British Medical Journal*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2550226/>
- Barkley, M., & FitzGerald, R. (1990). Influence of embryonic and maternal genotype on gestational events in the mouse. *Journal of Reproduction and Fertility*. Retrieved from <http://www.reproduction-online.org/content/89/1/285.short>
- Beaudoin, S., Barbet, P., & Bargy, F. (2003). Developmental stages in the rabbit embryo: guidelines to choose an appropriate experimental model. *Fetal Diagnosis and Therapy*. Retrieved from <http://www.karger.com/article/FullText/73136>
- Bergeron, D. (1996). Regulation of leukocyte interleukin 2 and interleukin 2 receptor gene expression by rabbit blastocoelic fluid. *Journal of Reproduction ...* Retrieved from <http://www.reproduction-online.org/content/106/1/143.short>
- Besenfelder, U., & Brem, G. (1993). Laparoscopic embryo transfer in rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility*. Retrieved from <http://www.reproduction-online.org/content/99/1/53.short>
- Blasco, A.; Bidanel, J.P; Santacreu, M. (1999). Efecto del tipo genético sobre el peso del embrión a 30 y 50 días de gestación en porcino. Estudio preliminar. Retrieved January 17, 2016, from <http://acteon.webs.upv.es/CONGRESOS/AIDA1999/ablasco.htm>
- Blasco, A. (1999). La descripción del crecimiento. *Informe Técnico No. 6*. Retrieved from <http://www.dcam.upv.es/dcia/ablasco/Unpublished/U2.-ITO6.PDF>
- Blasco, A. (2010). Apuntes de Genética Cuantitativa. *Genética*, 6–112. Retrieved from <http://www.mastergr.upv.es/Asignaturas/Apuntes/06.Cuantitativa1/Librocuantitativa.pdf>
- Blasco, A., Argente, M., Haley, C., & Santacreu, M. (1994). Relationships between components of litter size in unilaterally ovariectomized and intact rabbit does. *Journal of Animal ...* Retrieved from <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/72/12/3066>
- Blasco, A., Bidanel, J., Bolet, G., Haley, C., & Santacreu, M. (1993). The genetics of prenatal survival of pigs and rabbits: a review. *Livestock Production ...* Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030162269390061L>
- Boiti, C. (2004). Underlying Physiological Mechanisms Controlling the Reproductive Axis of Rabbit Does. *World Rabbit Science Association, 1*, 186–206. Retrieved from <http://world-rabbit-science.com/WRSA-Proceedings/Congress-2004-Puebla/Papers/Reproduction/R0-Boiti.pdf>
- Boland, M. P., Goulding, D., & Roche, J. F. (1991). Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, 35(1), 5–17. [http://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90143-2](http://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90143-2)
- Börsch, M., & Meinecke-Tillmann, S. (2004). Ultrasonographische Fetometrie beim Kaninchen. *Tierärztliche Praxis Kleintiere*. Retrieved from <http://www.schattauer.de/t3page/1214.html?manuscript=5265>
- Bosze Zs. (2010). Application of rabbits in biomedical research: a review. *World Rabbit Science*, 14(1), 01–14. <http://doi.org/10.4995/wrs.2006.712>
- Bradford, G. (1978). Genetic variation in prenatal survival and litter size. *Journal of*

- Animal Science*. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/400778>
- Brameld, J., Greenwood, P., & Bell, A. (2009). Biological mechanisms of fetal development relating to postnatal growth, efficiency and carcass characteristics in ruminants. *Managing the Prenatal*. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-90-481-3135-8_4
- Cappon, G., Fleeman, T., Chapin, R., & Hurtt, M. (2005). Effects of feed restriction during organogenesis on embryo-fetal development in rabbit. *Birth Defects Research* Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bdrb.20058/full>
- Carter, A. (1993). Restriction of placental and fetal growth in the guinea-pig, 2(14), 125–135. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Anthony_Carter2/publication/240050790_Restriction_of_placental_and_fetal_growth_in_the_guinea-pig/links/0c960524299b68586b000000.pdf
- Caton, J., Reed, J., & Aitken, R. (2009). Effects of maternal nutrition and stage of gestation on body weight, visceral organ mass, and indices of jejunal cellularity, proliferation, and vascularity in pregnant ewe. *Journal of Animal* Retrieved from <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/87/1/222>
- Chavatte-Palmer, P., Laigre, P., Simonoff, E., Chesné, P., Challah-Jacques, M., & Renard, J.-P. (2008). In utero characterisation of fetal growth by ultrasound scanning in the rabbit. *Theriogenology*, 69(7), 859–69. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.12.013>
- Chesné, P., Adenot, P., & Viglietta, C. (2002). Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* Retrieved from <http://www.nature.com/articles/nbt0402-366>
- Christians, E., Boiani, M., & Garagna, S. (1999). Gene expression and chromatin organization during mouse oocyte growth. *Developmental* Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160698991576>
- Chun, S., Eisenhauer, K., Kubo, M., & Hsueh, A. (1995). Interleukin-1 beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology*. Retrieved from <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/endo.136.7.7540548>
- Clark, R., Richard, T., Robertson, C., Peter, J., Bland, T., Nolan, L., & Delwin, L. (1986). Association between adverse maternal and embryo-fetal effects in norfloxacin-treated and food-deprived rabbits. *Toxicological* Retrieved from <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/7/2/272.short>
- Clemmons, D., & Maile, L. (2005). Interaction between insulin-like growth factor-I receptor and $\alpha V\beta 3$ integrin linked signaling pathways: cellular responses to changes in multiple signaling inputs. *Molecular Endocrinology*. Retrieved from <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/me.2004-0376>
- Constancia, M., Hemberger, M., Hughes, J., Dean, W., Ferguson-Smith, A., Fundele, R., & Al., E. (2002). Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature*. Retrieved from <http://www.nature.com/nature/journal/v417/n6892/abs/nature00819.html>
- Cowley, D. (1991a). Genetic prenatal maternal effects on organ size in mice and their potential contribution to evolution. *Journal of Evolutionary Biology*. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1420-9101.1991.4030363.x/abstract>

- Cowley, D. (1991b). Prenatal effects on mammalian growth: embryo transfer results. *The unity of evolutionary biology*, 2, 762–779.
- Cowley, D. E., Pomp, D., Atchley, W. R., Eisen, E. J., & Hawkins-Brown, D. (1989). The impact of maternal uterine genotype on postnatal growth and adult body size in mice. *Genetics*, 122(1), 193–203. Retrieved from <http://www.genetics.org/content/122/1/193.short>
- Crossey, P., Pillai, C., & Miell, J. (2002). Altered placental development and intrauterine growth restriction in IGF binding protein-1 transgenic mice. *The Journal of Clinical ...* Retrieved from <http://www.jci.org/articles/view/10077>
- Cubberley, D., Lee, T., Laughlin, C., Weintraub, B., Caudle, M., & Nielson, V. (1982). Importance of ultrasound determination of pregnancy in the rabbit. ... *Journal of Veterinary ...* Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/7149379>
- Cunningham, M. J., Clifton, D. K., & Steiner, R. a. (1999). Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biology of Reproduction*, 60, 216–222. <http://doi.org/10.1095/biolreprod60.2.216>
- Denton, K. M., Flower, R. L., Stevenson, K. M., & Anderson, W. P. (2003). Adult rabbit offspring of mothers with secondary hypertension have increased blood pressure. *Hypertension*, 41(3 Pt 2), 634–9. <http://doi.org/10.1161/01.HYP.0000052949.85257.8E>
- EFSA. (2005). The Impact of the current housing and husbandry systems on the health and welfare of farmed domestic rabbits, 267(June), 1–19. Retrieved from http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/267.pdf
- Eixarch, E., Hernandez-Andrade, E., Crispi, F., & Illa, M. (2011). Impact on fetal mortality and cardiovascular Doppler of selective ligation of uteroplacental vessels compared with undernutrition in a rabbit model of intrauterine. *Placenta*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143400411000257>
- Ernst, C., Rhees, B., Miao, C., & Atchley, W. (2000). Effect of long-term selection for early postnatal growth rate on survival and prenatal development of transferred mouse embryos. *Journal of Reproduction ...* Retrieved from <http://www.reproduction-online.org/content/118/1/205.short>
- Estany, J., Camacho, J., Baselga, M., & Blasco, A. (1992). Selection response of growth rate in rabbits for meat production. *Genetics Selection ...* Retrieved from http://www.gse-journal.org/articles/gse/pdf/1992/06/GSE_0999-193X_1992_24_6_ART0004.pdf
- FAOSTAT. (2016). Producing of rabbit's meat and slaughtered (by 1000 Head) in the European Union + (Total). Retrieved January 17, 2016, from <http://faostat.fao.org/site/569/DesktopDefault.aspx?PageID=569#ancor>
- Feki, S., Baselga, M., Blas, E., Cervera, C., & Gómez, E. (1996). Comparison of growth and feed efficiency among rabbit lines selected for different objectives. *Livestock Production*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030162269500081X>
- Ferraz, P. A., Burnley, C., Karanja, J., Viera-Neto, A., Santos, J. E. P., Chebel, R. C., & Galvão, K. N. (2016). Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. *Theriogenology*. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.032>

- Fischer, B., Chavatte-Palmer, P., Viebahn, C., Navarrete-Santos, A., & Duranthon, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. Retrieved from <http://www.reproduction-online.org/content/144/1/1.short>
- Fortun, L., Prunier, A., & Lebas, F. (1993). Effects of lactation on fetal survival and development in rabbit does mated shortly after parturition. *Journal of Animal Science*. Retrieved from <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/71/7/1882>
- Fortun-Lamothe, L. (2006). Energy balance and reproductive performance in rabbit does. *Animal Reproduction Science*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432005001776>
- Fujimoto, S. (1974). Hormonal influences on the time of ovulation in the rabbit as determined by laparoscopy. *Journal of Reproduction* Retrieved from <http://www.reproduction-online.org/content/38/1/97.short>
- Garcia, F., Baselga, M., Blasco, A., & Deltoro, J. (1982). Genetic analysis of some productive traits in meat rabbits. 2-A genetic study of growth traits. ... *on Genetic Applied to Livestock Production*. Retrieved from <https://scholar.google.es/scholar?hl=es&q=Garcia+F.%2C+Baselga+M.%2C+Blasco+A.%2C+Deltoro+J.+1982.+Genetic+analysis+of+some+productive+traits+in+meat+rabbits.+Il.+Ponderal+traits.+In%3A+Proc.2nd+World+Congress+on+Genetic+s+Applied+to+Livestock+Production%2>
- Garcia, M., & Baselga, M. (2002a). Estimation of correlated response on growth traits to selection in litter size of rabbits using a cryopreserved control population and genetic trends. *Livestock Production Science*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301622602000933>
- Garcia, M., & Baselga, M. (2002b). Estimation of genetic response to selection in litter size of rabbits using a cryopreserved control population. *Livestock Production Science*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301622601002809>
- Geisert, R., & Schmitt, R. (2002). Early embryonic survival in the pig: can it be improved? *Journal of Animal Science*. Retrieved from https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/80/E-Suppl_1/JAN0080ES10E54
- Gidenne, T., Combes, S., Feugier, A., Jehl, N., Arveux, P., Boisot, P., ... Verdelhan, S. (2009). Feed restriction strategy in the growing rabbit. 2. Impact on digestive health, growth and carcass characteristics. *Animal*, 3(04), 509. <http://doi.org/10.1017/S1751731108003790>
- Gómez, E., Baselga, M., Rafel, O., & García, M. (1999). Selection, diffusion and performances of six Spanish lines of meat rabbit. *Cahiers Options*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=QC1999000116>
- Gonzalez, P., & Caravac, F. P. (2013). Producción de conejos de aptitud cárnica. Retrieved April 30, 2016, from http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/09_10_34_Cunicultura.pdf
- Griffin, P., Bienen, L., Gillin, C., & Mills, L. (2003). Estimating pregnancy rates and litter size in snowshoe hares using ultrasound. *Wildlife Society Bulletin*. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/3784453>
- Hafez, E., & Tsutsumi, Y. (1966). Changes in endometrial vascularity during implantation and pregnancy in the rabbit. *American Journal of Anatomy*. Retrieved

- from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aja.1001180113/full>
- Herr, F., Olin, D., Herrero, J., Lang, U., Preissner, K. T., Han-Victor, K., & Zygmunt, M. (2003). Possible angiogenic roles of insulin-like growth factor II and its receptors in uterine vascular adaptation to pregnancy. *The Journal of ...* Retrieved from <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/jc.2003-030243>
- Hildebrandt, T. B., Hermes, R., Jewgenow, K., & Göritz, F. (2000). Ultrasonography as an important tool for the development and application of reproductive technologies in non-domestic species. *Theriogenology*, 53(1), 73–84. [http://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00241-1](http://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00241-1)
- Hoffman, L., Olson, G., Carson, D., & Chilton, B. (1998). Progesterone and Implanting Blastocysts Regulate Muc1 Expression in Rabbit Uterine Epithelium 1. *Endocrinology*. Retrieved from <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/endo.139.1.5750>
- Huang, H., Wang, B., Yang, X., Luo, Q., & Sheng, J. (2005). Nitric oxide mediates inhibitory effect of leptin on insulin-like growth factor I augmentation of 17 β -estradiol production in human granulosa cells. *Biology of ...* Retrieved from <https://www.biolreprod.org/content/72/1/102.full>
- Jainudeen, M. ., Wahid, H., & Hefez, E. S. . (1996). Inducción de ovulación, producción y tranferencia de embriones. In Interamericana (Ed.), *Reproducción e inseminación artificial en animales* (Tercera, pp. 415–440).
- Kafi, M., & McGowan, M. R. (1997). Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science*, 48(2-4), 137–157. [http://doi.org/10.1016/S0378-4320\(97\)00033-X](http://doi.org/10.1016/S0378-4320(97)00033-X)
- Kaminski, M., Ford, S., Youngs, C., & Conley, A. (1996). Lack of effect of sex on pig embryonic development in vivo. ... of *Reproduction and ...* Retrieved from <http://www.reproduction-online.org/content/106/1/107.short>
- Koenig, J., Zimmermann, D., Eldridge, F., & Kopf, J. (1986). The effect of superovulation and selection for high ovulation rate on chromosomal abnormalities in swine ova. *J. Anim. Sci.* Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?q=koenig+j.l.f.%2c+zimmerman+d.r.%2C+ELDRIDGE+F.E.%2C+KOPF+J.D.+1986.+The+effect+of+superovulation+and+selection+for+high+ovulation+rate+on+chromosomal+abnormalities+in+swine+ova.+J.+Anim.+Sci.+%28Suppl+1%29+63%3A+202.&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5#0
- Lebas, F. (2010). Cuniculture: Biologie du Lapin chapitre 7.4 : Lapereaux Conception-Sevrage. Retrieved January 30, 2016, from <http://www.cuniculture.info/Docs/Biologie/biologie-07-4.htm>
- Ledin, I. (1984). Effect of restricted feeding and realimentation on compensatory growth, carcass composition and organ growth in rabbit, 33(1). Retrieved from <https://hal.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/888269/filename/hal-00888269.pdf>
- Li, Y., & Geng, Y. (2010). A potential role for insulin-like growth factor signaling in induction of pluripotent stem cell formation. *Growth Hormone & IGF Research*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096637410001188>
- Liu, Z., Foote, R., & Simkin, M. (1996). Effect of amino acids and alpha-amanitin on the development of rabbit embryos in modified protein-free KSOM with HEPES. *Molecular Reproduction and ...* Retrieved from [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1098-](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1098-)

2795(199610)45:2%3C157::AID-MRD8%3E3.0.CO;2-S/pdf

- Llobat, L., Marco-Jiménez, F., Peñaranda, D., Thieme, R., Navarrete, A., & Vicente, J. (2012). mRNA expression in rabbit blastocyst and endometrial tissue of candidate gene involved in gestational losses. ... in *Domestic Animals*. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2011.01855.x/full>
- Manal, A., Tony, M., & Ezzo, O. (2010). Feed restriction of pregnant nulliparous rabbit does: consequences on reproductive performance and maternal behaviour. *Animal Reproduction Science*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432010000771>
- Martínez-Paredes, E., Ródenas, L., Martínez-Vallespín, B., Cervera, C., Blas, E., Brecchia, G., ... Pascual, J. (2012). Effects of feeding programme on the performance and energy balance of nulliparous rabbit does. Retrieved from http://journals.cambridge.org/abstract_S1751731111002643
- Masuda, M., Kubota, T., Karnada, S., & Aso, T. (1997). Nitric oxide inhibits steroidogenesis in cultured porcine granulosa cells. *Molecular Human ...* Retrieved from <http://molehr.oxfordjournals.org/content/3/4/285.short>
- Matsuoka, T., Mizoguchi, Y., Seriazawa, K., Shikura, T., Mizuguchi, H., & Anzo, Y. (2006). Effects of stage and degree of restricted feeding on pregnancy outcome in rabbits. *The Journal of ...* Retrieved from <http://jlc.jst.go.jp/DN/JALC/00279656779?from=Google>
- Matsuzawa, T., Nakata, M., Goto, I., & Tsushima, M. (1981). Dietary deprivation induces fetal loss and abortion in rabbits. *Toxicology*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0300483X81900883>
- McEvoy, T., Sinclair, K., & Young, L. (2000). Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo culture in vitro: relevance to blastocyst culture in human ART. *Human ...* Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1464727002000199061>
- McMillen, I., & Robinson, J. (2005). Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiological Reviews*. Retrieved from <http://physrev.physiology.org/content/85/2/571.short>
- Mínguez-Balaguer, C. (2012, May 31). Comparacion de cuatro líneas maternas de conejo en caracteres de crecimiento. Retrieved from <https://riunet.upv.es/handle/10251/15929>
- Mocé, M. L., Santacreu, M., 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), 68–73.
- Moler, T., Donahue, S., & Anderson, G. (1980). Effects of maternal and embryonic genotype on prenatal survival in two selected mouse lines. *Journal of Animal*. Retrieved from <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/51/2/JAN0510020300>
- Montoudis, A., Simoneau, L., & Lafond, J. (2004). Influence of a maternal cholesterol-enriched diet on -linoleic acid and L--leucine entry in plasma of rabbit offspring. *Life Sciences*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320503010956>
- Nafeaa, A., Ahmed, S., & Hallah, S. F. (2011). Effect of feed restriction during pregnancy on performance and productivity of New Zealand white rabbit does. *Veterinary Medicine International*. Retrieved from

- <http://www.hindawi.com/journals/vmi/2011/839737/abs/>
- Naturil-Alfonso, C., Lavara, R., Millán, P., Rebollar, P. G., Vicente, J. S., & Marco-Jiménez, F. (2016). Study of failures in a rabbit line selected for growth rate. *World Rabbit Science*, 24(1), 47. <http://doi.org/10.4995/wrs.2016.4016>
- Naturil-Alfonso, C., Lavara, R., Vicente, J., & Marco-Jiménez, F. (2016). Effects of Female Dietary Restriction in a Rabbit Growth Line During Rearing on Reproductive Performance and Embryo Quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(1), 114–122. <http://doi.org/10.1111/rda.12653>
- Naturil-Alfonso, C., Marco-Jiménez, F., Jiménez-Trigos, E., Saenz-de-Juano, M., Viudes-de-Castro, M., Lavara, R., & Vicente, J. (2015). Role of Embryonic and Maternal Genotype on Prenatal Survival and Foetal Growth in Rabbit. ... in *Domestic Animals*.
- Olivennes, F., Fanchin, R., & Ledee, N. (2002). Perinatal outcome and developmental studies on children born after IVF. *Human Reproduction* Retrieved from <http://humupd.oxfordjournals.org/content/8/2/117.short>
- Palinski, W., & D'Armiento, F. (2001). Maternal hypercholesterolemia and treatment during pregnancy influence the long-term progression of atherosclerosis in offspring of rabbits. *Circulation* Retrieved from <http://circres.ahajournals.org/content/89/11/991.short>
- Pandian, A., Lambert, R., & Roy, R. (1988). Immunosuppressive effects of rabbit blastocoelic fluid and embryo culture medium. *Journal of Reproductive Immunology*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165037888900034>
- Peiró, R., Santacreu, M., Climent, A., & Blasco, A. (2007). Early embryonic survival and embryo development in two lines of rabbits divergently selected for uterine capacity. *Journal of Animal* Retrieved from <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/85/7/0851634>
- Pérez Pardo, R. (2015, October 7). Estudio de la supervivencia de los gazapos desde el nacimiento hasta el destete en varias líneas de selección en conejos. Retrieved from <https://riunet.upv.es/handle/10251/55740>
- Petersen, J., & Martínez-Vásquez, R. (2007). Influencia del rendimiento maternal antes y después del parto sobre el desarrollo de conejos de engorde. Retrieved December 29, 2015, from <https://www.engormix.com/MA-cunicultura/articulos/influencia-rendimiento-maternal-antes-t1334/103-p0.htm>
- Petrere, J., William, R., Rohn, W., Lonnie, E., Grantham, I., & John, A. (1993). Food restriction during organogenesis in rabbits: effects on reproduction and the offspring. *Fundamental and Applied* Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272059083711280>
- Petronis, A. (2010). Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases. *Nature*. Retrieved from <http://www.nature.com/nature/journal/v465/n7299/abs/nature09230.html>
- Piattoni, F., Maertens, L., & Mazzoni, D. (1999). Effect of weaning age and solid feed distribution before weaning on performances and caecal traits of young rabbits. *Cahiers Options*. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Luc_Maertens/publication/265157724_effect_of_weaning_age_and_solid_feed_distribution_before_weaning_on_performances_and_caecal_traits_of_young_rabbits/links/54cf233b0cf24601c092e63c.pdf

- Poigner, J., Zs, S., Lévai, A., Radnai, I., & Biró-Németh, E. (2010). Effect of birth weight and litter size on growth and mortality in rabbits. *World Rabbit Science*. Retrieved from <http://ojs.upv.es/index.php/wrs/article/view/413/400>
- Pope, W., & Xie, S. (1989). Causes and consequences of early embryonic diversity in pigs. *Journal of Reproduction* Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/2192042>
- Quevedo, F., Pascual, J., Blas, E., & Cervera, C. (2003). Influencia de la madre sobre el crecimiento y la mortalidad de los gazapos en cebo. ... *de Cunicultura*: 2, 3 Y 4 Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2881772.pdf>
- Rao, D., & Sunki, G. (1977). Postnatal growth of New Zealand White rabbit. *Journal of Animal* Retrieved from <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/44/6/JAN0440061021>
- Rinck, I., Sehic, M., Butkovic, V., Stanin, D., & Kadunc, I. (1993). Ultrasonographic diagnosis of pregnancy in the rabbit. *Vet Arc*. Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?q=Rinck+I%2C+Sehic+M%2C+Butkovic+V%2C+Stanin+D%2C+Kadunc+I.+Ultrasono-+graphic+diagnosis+of+pregnancy+in+the+rabbit.+Vet+Arc+1993%3B63%3A+61%E2%80%93935.&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5#0
- Roca, T., & Mateo, A. (2011). Enfermedades más comunes en cunicultura. Retrieved January 31, 2016, from <http://www.conejos-info.com/articulos/enfermedades-mas-comunes-en-cunicultura>
- Roellig, K., Goeritz, F., & Hildebrandt, T. B. (2010). Ultrasonographic characterisation of prenatal development in European brown hares (*Lepus europaeus* PALLAS, 1778): An evolutionary approach. *Reproduction, Fertility and Development*, 22, 448–458. <http://doi.org/10.1071/RD09098>
- Roseboom, T. (2000). Plasma lipid profiles in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *The American Journal* Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/content/72/5/1101.short>
- Santacreu, M. (2006). La supervivencia prenatal de una coneja reproductora. XXXI *Symposium de cunicultura*. Ayuntamiento de Lorca. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2879059>
- Santacreu, M., Mocé, M., Climent, A., & Blasco, A. (2005). Divergent selection for uterine capacity in rabbits. II. Correlated response in litter size and its components estimated with a cryopreserved control population. *Journal of Animal* Retrieved from <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/83/10/0832303>
- Santacreu, M., Viudes-de-Castro, P., & Blasco, A. (1990). Evaluation par coelioscopie des corps jaunes et des embryons. Influence sur la taille de portée chez la lapine. *Reproduction Nutrition* Retrieved from http://rnd.edpsciences.org/articles/rnd/pdf/1990/05/RND_0181-1916_1990_30_5_ART0003.pdf
- Smidt, D., & Niemann, H. (1999). Biotechnology in genetics and reproduction. *Livestock Production Science*, 59(2-3), 207–221. [http://doi.org/10.1016/S0301-6226\(99\)00028-7](http://doi.org/10.1016/S0301-6226(99)00028-7)
- Swanson, A., & David, A. (2015). Animal models of fetal growth restriction: Considerations for translational medicine. *Placenta*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143400415008607>

- Symeon, G. K., Goliomytis, M., Bizelis, I., & Papadomichelakis, G. (2015). Effects of Gestational Maternal Undernutrition on Growth , Carcass Composition and Meat Quality of Rabbit Offspring, 1–11. <http://doi.org/10.5061/dryad.ns313>
- Tao, T., & Niemann, H. (2000). Cellular characterization of blastocysts derived from rabbit 4-, 8-and 16-cell embryos and isolated blastomeres cultured in vitro. *Human Reproduction*. Retrieved from <https://humrep.oxfordjournals.org/content/15/4/881.full>
- Taylor, P., & Poston, L. (2007). Developmental programming of obesity in mammals. *Experimental Physiology*. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/expphysiol.2005.032854/full>
- Torres, C., Pla, M., & García, F. (1986). Evolución del peso de la coneja y de sus gazapos durante la lactancia. *XI Symposium de Cunicultura*. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2923010.pdf>
- Turner, A., & Trudinger, B. (2009). A modification of the uterine artery restriction technique in the guinea pig fetus produces asymmetrical ultrasound growth. *Placenta*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143400408003962>
- van der Waaij, E., Hazeleger, W., Soede, N., Laurensen, B., & Kemp, B. (2010). Effect of excessive, hormonally induced intrauterine crowding in the gilt on fetal development on day 40 of pregnancy. ... of *Animal Science*. Retrieved from <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/88/8/2611>
- Vicente, J. S.; Viudes-de-Castro, M. (2000). Manejo reproductivo en conejo. Retrieved July 20, 2015, from <http://home.utad.pt/apez/APEZNorte/2000/Cunicultura/S4.htm>
- Vicente, J., García-Jiménez, F., & Viudes-de-Castro, M. (1995). Neonatal performances in 3 lines of rabbit (litter sizes, litter and individual weights). *Annales de ...* Retrieved from <https://hal.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/889182/filename/hal-00889182.pdf>
- Vicente, J., Llobat, L., Viudes-de-Castro, M., Lavara, R., Baselga, M., & Marco-Jiménez, F. (2012). Gestational losses in a rabbit line selected for growth rate. *Theriogenology*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X11003517>
- Vicente, J., Llobat, M., Jiménez-Trigos, E., Lavara, R., & Marco-Jiménez, F. (2013). Effect of embryonic and maternal genotype on embryo and foetal survival in rabbit. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 48(3), 402–6. <http://doi.org/10.1111/rda.12087>
- Vicente, J. S., Saenz-de-Juano, M. D., Jiménez-Trigos, E., Viudes-de-Castro, M. P., Peñaranda, D. S., & Marco-Jiménez, F. (2013). Rabbit morula vitrification reduces early foetal growth and increases losses throughout gestation. *Cryobiology*, 67(3), 321–326. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.09.165>
- Viudes-de-Castro, M., Cortell, C., Mocé, E., Marco-Jiménez, F., Joly, T., & Vicente, J. S. (2009). Effect of recombinant gonadotropins on embryo quality in superovulated rabbit does and immune response after repeated treatments. *Theriogenology*, 72(5), 655–62. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.04.022>
- Viudes-de-Castro, M., & Vicente, J. (1989). Estudios preliminares de lactación artificial en conejo. ... de *Cunicultura: Manresa*, 12, 13 Y Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2906367.pdf>

- Wigglesworth, J. (1974). Fetal growth retardation. Animal model: uterine vessel ligation in the pregnant rat. *The American Journal of Pathology*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1910905/>
- Wilmut, I., Sales, D., & Ashworth, C. (1986). Maternal and embryonic factors associated with prenatal loss in mammals. *Journal of Reproduction and ...* Retrieved from <http://www.reproduction-online.org/content/76/2/851.short>
- Wishart, J., & Hammond, J. (1933). A statistical analysis of the interrelations of litter size and duration of pregnancy on the birth weight of rabbits. *J Agric Sci*. Retrieved from <http://journals.cambridge.org/production/action/cjoGetFulltext?fulltextid=4716848>
- Wolfenson, D., & Blum, O. (1988). Embryonic development, conception rate, ovarian function and structure in pregnant rabbits heat-stressed before or during implantation. *Animal Reproduction Science*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378432088900632>
- Woodall, S., Breier, B., Johnston, B., Bassett, N., Barnard, R., & Gluckman, P. (1999). Administration of growth hormone or IGF-I to pregnant rats on a reduced diet throughout pregnancy does not prevent fetal intrauterine growth retardation and elevated. *Journal of ...* Retrieved from <http://joe.endocrinology-journals.org/content/163/1/69.short>
- Yamauchi, J., Miyazaki, T., Iwasaki, S., Kishi, I., Kuroshima, M., Tei, C., & Yoshimura, Y. (1997). Effects of Nitric Oxide on Ovulation and Ovarian Steroidogenesis and Prostaglandin Production in the Rabbit 1. Retrieved from <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/endo.138.9.5392>
- Yoshinaga, K. (1988). Uterine receptivity for blastocyst implantation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1988.tb22279.x/full>
- Youngs, C., Christenson, L., & Ford, S. (1994). Investigations into the control of litter size in swine: III. A reciprocal embryo transfer study of early conceptus development. *Journal of Animal ...* Retrieved from <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/72/3/725>
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425–32. <http://doi.org/10.1038/372425a0>