

CONTROL DEL DÉFICIT ENERGÉTICO Y ACTIVIDAD OVÁRICA DE CONEJAS PRIMIPARAS SOMETIDAS A DESTETE TEMPRANO

Sakr O.G.^a; García-García R.M.^b; Arias-Álvarez M.^b; Millán P.^b; Lorenzo P.L.^b;
Rebollar P.G.^a

^aDepartamento de Producción Animal. E.T.S.I.A. Universidad Politécnica de Madrid

^bDepartamento de Fisiología (Fisiología Animal). Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Correo electrónico: pilar.grebollar@upm.es

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue estudiar el efecto de un destete temprano, realizado a los 25 días post-parto (dpp), con el fin de reducir el déficit energético de las conejas primíparas y mejorar su eficacia reproductiva. Para ello, se estudió el efecto sobre las reservas corporales y la actividad ovárica de 34 conejas primíparas lactantes. Se sacrificó un grupo (n=10) a los 25 dpp (L25), otro (n=13) se destetó a los 25 dpp y se sacrificó a los 32 dpp (NL32) y un tercero (n=11), no se destetó y se sacrificó a los 32 dpp (L32). El peso vivo de los animales, las concentraciones de ácidos grasos no esterificados (AGNE) y de proteínas plasmáticas totales en el suero fueron similares en todos los grupos. Aunque el grupo NL32, después del destete, consumió menos alimento que el grupo L32 ($122 \pm 23,5$ vs. $402 \pm 26,7$ g/d, respectivamente; $P < 0,001$), sus contenidos estimados de lípidos ($16,9 \pm 1,09\%$; $P < 0,008$), proteína ($19,7 \pm 0,07\%$; $P < 0,0001$) y energía corporales ($1147 \pm 42,7$ MJ/kg; $P < 0,006$) fueron mayores, y sus concentraciones plasmáticas de glucosa ($158 \pm 24,5$ mg/dl; $P < 0,04$) fueron menores que las del grupo L25 ($11,9 \pm 1,3\%$, $18,5 \pm 0,08\%$, $942 \pm 51,3$ MJ/kg y $212 \pm 27,9$ mg/dl) y que las del grupo L32, ($13,4 \pm 1,03\%$, $18,5 \pm 0,1\%$, $993 \pm 40,4$ MJ/kg and $259 \pm 29,5$ mg/dl), respectivamente. El recuento de la población folicular en los ovarios fue similar en los tres grupos. La maduración nuclear (% de oocitos en metafase II) y la citoplásmica (% de gránulos corticales total o parcialmente migrados) fue significativamente menor en el grupo sacrificado a los 25 dpp (L25), que en los grupos NL32 y L32 (67 vs. $79,7$ y $78,3\%$; $P < 0,05$; 16 vs. $38,3$ y $60,0\%$; $P < 0,05$, respectivamente). En conclusión, las reservas energéticas de la coneja primípara aumentan si es destetada a 25 dpp. Sin embargo, esta estrategia no es suficiente desde el punto de vista reproductivo, ya que a los 32 dpp, la actividad ovárica de las conejas es similar independientemente de si han sido destetadas previamente o no.

Palabras Clave: reservas energéticas, destete, conejas primíparas.

INTRODUCCIÓN

Las conejas primíparas no consiguen contrarrestar las altas necesidades nutricionales de la lactación y presentan un claro déficit energético (Parigi Bini y Xiccato, 1998), lo cual, reduce sus depósitos de grasa y es parcialmente responsable de sus bajos rendimientos reproductivos (Castellini et al., 2006). Se ha comprobado que si se inseminan siguiendo un ritmo extensivo, se mejora claramente su estado nutricional, su fertilidad y la duración de su vida reproductiva (Castellini et al., 2003; Feugier y Fortun Lamothe, 2006). Cuando se inseminan a 32 dpp, sólo 4 días después del destete, Arias-Álvarez et al. (2009) demostraron que se mejora la composición corporal, las reservas energéticas, las concentraciones de leptina y de proteínas plasmáticas de las conejas, así como la calidad de las poblaciones foliculares ováricas y de los oocitos. Como consecuencia, la fertilidad y la prolificidad son mejores que si se inseminan a 11 dpp.

Por otro lado, un destete temprano a los 21-25 dpp en primíparas parece mejorar su condición corporal. En este sentido, Feugier y Fortun-Lamothe (2006) demostraron que realizando un destete a los 23 dpp, las conejas movilizan menos grasa que cuando se destetan los 35 dpp. Sin embargo, en ambos casos, los resultados de fertilidad cuando se inseminan a los 25 dpp no mejoran. Además, parece ser que el destete temprano (a 21 ó 25 dpp) hace que la coneja disminuya el consumo de

alimento, reduciendo la recuperación de energía y retrasando la recuperación de reservas corporales (Xiccato et al., 2005). Nuestro objetivo, por tanto, va a ser estudiar el efecto de un destete temprano sobre la composición corporal, los parámetros metabólicos séricos y la actividad ovárica de conejas primíparas lactantes, cuando son inseminadas según un ritmo extensivo de cubrición (a 32 dpp), parámetros que no se han estudiado previamente.

MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado un total de 34 conejas primíparas lactantes (California x NZW) alojadas en la granja experimental de la UPM, en jaulas metálicas individuales (50x70x32cm) bajo condiciones ambientales controladas (16 h de luz, 18-22°C, 60-75% humedad). Se alimentaron con un pienso comercial *ad libitum* (NANTA S.A., Tres Cantos, Madrid) con un 16% de proteína, un 15,7% de fibra bruta, un 2,5% de grasa y una energía digestible de 2.700 Kcal/kg. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la UPM (BOE, 2005, 2010).

Las camadas de las conejas se igualaron a 8 gazapos y este número se mantuvo constante reemplazando las bajas con gazapos de la misma edad y peso. Las hembras se distribuyeron al azar en tres grupos: el grupo L25 (n=10) se sacrificó a los 25 dpp sin destetar, el grupo L32 (n=11) se sacrificó a los 32 dpp sin destetar y el grupo NL32 (n=13) se destetó a los 25 dpp y se sacrificó a los 32 dpp. El día del sacrificio se determinó: el peso, la composición corporal, las concentraciones séricas de glucosa, de ácidos grasos no esterificados (AGNE) y de proteínas plasmáticas totales. Además, se calculó el consumo de alimento desde el parto hasta el día 25 pp, así como el de las conejas y sus camadas entre el día 25 y 32 pp. El sacrificio se realizó administrando 30 mg/Kg de pentobarbital sódico i.v. (Dolethal, Vetoquinol). Los ovarios se extrajeron mediante una laparotomía media ventral.

La composición corporal se estimó mediante un análisis de bioimpedancia (BIA) utilizando el aparato Model Quantum II (RJL Systems, Detroit, MI, USA) siguiendo el procedimiento descrito por Pereda (2010). Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena marginal de la oreja en tubos no heparinizados a las 9:00 a.m., después se centrifugaron a 1200 g., 10 minutos a 4°C y se almacenaron a -32°C. Los AGNE se determinaron con el kit Wako Chemicals GmbH Specialty Chemicals (Neuss, Germany). La glucosa con el método GOD-PAP y las proteínas plasmáticas totales con el método Biuret, ambos métodos de los laboratorios RANDOX (Crumlin, UK).

En los ovarios se determinó el número de folículos antrales ≥ 1 mm de diámetro y de folículos hemorrágicos en la superficie ovárica. Después, uno de cada coneja se almacenó en una solución de paraformaldehído al 4% (pH 7,2-7,4), se deshidrató en diluciones crecientes de etil-alcohol, se introdujo en parafina, se seccionó en cortes de 5 μ m de grosor y se tiñó con hematoxilina-eosina. En dichos cortes (2 por ovario) se estudiaron las poblaciones foliculares con un microscopio óptico (Olympus BX40, Hamburg, Germany), considerando diferentes grados de desarrollo (folículos primarios, preantrales y antrales) según el número de capas de la granulosa de acuerdo a Rebollar et al. (2008). De los restantes ovarios de cada animal se aspiraron los complejos cúmulo-oocito (CCOs) de los folículos antrales ≥ 1 mm de diámetro. Se lavaron y se maduraron durante 16h a 38°C y en una atmósfera de 5% de CO₂, a máxima humedad y en 500 μ l de un medio de maduración, según la composición descrita por Lorenzo et al. (1997). Después, los CCOs se estudiaron con microscopía confocal tal y como describieron Arias-Álvarez et al. (2007). El grado de maduración nuclear se determinó por el porcentaje de oocitos que mostraron la configuración nuclear de metafase II. El grado de maduración citoplásmica, se determinó según el patrón de migración de los gránulos corticales (GCs) que presentaban los oocitos, clasificándose como migrados o maduros (aquellos en los que los GCs estaban adyacentes a la membrana plasmática); parcialmente migrados (si los GCs estaban en la zona cortical indicando un inicio de maduración); inmaduros o no migrados (si los GCs estaban distribuidos por todo el citoplasma sin iniciar migración) o anormalmente

migrados (con una distribución anómala compatible con oocitos de baja calidad o degenerados).

Los datos se analizaron con el software Statistical Analysis Systems (SAS/STAT 1999-2001). El peso vivo, la composición corporal, el consumo, el número de folículos hemorrágicos, el de folículos de diámetro ≥ 1 mm, y el de cada categoría folicular se analizaron con el procedimiento GLM (tres grupos de animales: L25, NL32 y L32, en dos momentos: 25 y 32 dpp). Las medias se compararon con el test *t* de Student. Los porcentajes de maduración nuclear y citoplásmica de los oocitos se compararon con el procedimiento CATMOD. Todos los resultados se muestran como medias \pm error estándar de la media.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El destete temprano no afectó al peso de las conejas (Tabla 1). En el grupo NL32, la cantidad corporal estimada de agua fue menor ($P < 0,001$), y la de lípidos ($P < 0,01$), proteína ($P < 0,001$), y energía ($P < 0,01$) fue mayor que en los otros dos grupos experimentales. Estos resultados han confirmado los descritos previamente en primíparas por Xiccato et al. (2005) y Feugier y Fortun-Lamothe (2006). En nuestro estudio, las conejas lactantes en día 32 pp tienen las mismas reservas que a día 25 pp. Sin embargo, en las destetadas aumentaron sus reservas corporales, de modo que a los 32 dpp tenían 154 y 205 Mj/kg más de contenido energético que las lactantes a 25 y a 32 dpp, respectivamente. El cese de producción de leche durante 7 días mejoró sus reservas y como consecuencia el contenido estimado en lípidos y proteínas también aumentó.

Tabla 1. Peso vivo, composición corporal estimada, consumo y parámetros séricos de conejas primíparas de los grupos L25 (lactantes en el día 25 pp), L32 (lactantes en el día 32 pp) y NL32 (destetadas en día 25pp).

| | Día 25 pp | | Día 32 pp | |
|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--|
| | L25 | NL32 | L32 | |
| Nº de hembras | 10 | 13 | 11 | |
| Peso (kg) | 3,86 \pm 0,14 | 3,91 \pm 0,94 | 3,68 \pm 1,13 | |
| Agua (%) | 65,9 \pm 1,06 ^A | 61,5 \pm 0,89 ^B | 66,9 \pm 1,07 ^A | |
| Cenizas(%) | 3,09 \pm 0,05 | 3,04 \pm 0,04 | 3,14 \pm 0,04 | |
| Lípidos (%) | 13,4 \pm 1,03 ^b | 16,9 \pm 0,09 ^a | 11,9 \pm 1,31 ^b | |
| Proteínas (%) | 18,5 \pm 0,10 ^B | 19,7 \pm 0,07 ^A | 18,5 \pm 0,08 ^B | |
| Energía (Mj/kg) | 993 \pm 40,4 ^b | 1147 \pm 2,7 ^a | 942 \pm 51,3 ^b | |
| Consumo (g/d) | | | | |
| Del parto a 25 dpp | 345 \pm 19,6 | 357 \pm 17,2 | 359 \pm 17,9 | |
| De 25 a 32 dpp ¹ | - | 122 \pm 23,5 ^A | 402 \pm 26,7 ^B | |
| Concentraciones séricas | | | | |
| AGNE (mmol/L) | 0,26 \pm 0,04 | 0,23 \pm 0,03 | 0,19 \pm 0,04 | |
| Glucosa (mg/dl) | 212 \pm 27,9 ^{ab} | 158 \pm 24,5 ^b | 259 \pm 29,5 ^a | |
| Proteínas totales (g/dl) | 7,60 \pm 1,26 | 7,40 \pm 1,10 | 6,50 \pm 1,33 | |

pp: post-parto. AGNE: Ácidos grasos no esterificados. A, B: $P < 0,001$; a, b: $P < 0,01$ en la misma fila.
¹Calculado considerando el tamaño de camada de la coneja (8 gazapos) y un consumo medio de pienso por gazapo de 30 g/d.

El consumo de alimento desde el parto hasta el día 25 pp fue similar en todos los grupos. Sin embargo, tal y como esperábamos, el grupo NL32 lo redujo desde el día 25 al 32 pp ($P < 0,0001$) y a pesar de eso, mejoraron sus reservas corporales. Según Xiccato et al. (2005), la reducción voluntaria del consumo debida a un mecanismo quimiostático de regulación del apetito después del destete es de un 35-45 %. Este hecho explica las menores concentraciones de glucosa observadas en el grupo NL32 con respecto al L32 ($P < 0,004$). Cuando las concentraciones de glucosa caen, los

AGNE se liberan al torrente sanguíneo (Brecchia et al., 2006). Sin embargo, en nuestro estudio, no hemos observado diferencias en este sentido entre las lactantes y las no lactantes y Arias-Álvarez et al. (2009), tampoco observaron diferencias entre el día 11 pp y el día 32 pp. Por lo tanto pensamos que las bajas concentraciones de glucosa observadas en las NL32 no han tenido consecuencia directa en las concentraciones de AGNE y, además, tal y como afirman Xiccato et al. (2005), existe una variabilidad individual elevada en este parámetro.

No hubo diferencias en el número de folículos hemorrágicos ni en las poblaciones foliculares entre los grupos (Tabla 2). Sin embargo, el grupo L25 presentó un menor número de folículos $\geq 1\text{mm}$ en la superficie ovárica que los otros dos grupos ($P < 0,05$). Esto concuerda con su peor composición corporal, y tal y como describen Diskin et al. (2003) en vacas, correspondería con cambios endocrinos que podrían afectar al crecimiento folicular. No obstante, estos animales producen continuamente folículos maduros que se atresian si la ovulación no es inducida por el coito o por una inyección de un análogo de GnRH (Kranzfelder et al., 1984). Ubilla y Rebollar (1995) sugirieron la presencia de una onda de crecimiento folicular entre los días 23 a 30 del post-parto en conejas lactantes no preñadas. Los resultados de nuestro estudio corroboran la existencia de esta onda folicular independientemente de si la coneja está lactante o no lo está. Según Diskin et al. (2003), las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina y leptina son las principales indicadores del estado metabólico del animal. En nuestro trabajo, el desarrollo folicular ha tenido lugar independientemente de la lactación y de la disponibilidad de glucosa, ya que la glucemia fue diferente en lactantes y en no lactantes en el día 32 pp.

En nuestro estudio, los oocitos madurados *in vitro* de todas las conejas lactantes o no, el día 32 pp, mostraron unas tasas de maduración nuclear y citoplásmica mejores que a día 25 pp. Además, el porcentaje de oocitos inmaduros fue superior el día 25 pp, con lo que podemos confirmar que los parámetros reproductivos ováricos mejoran a medida que avanza el periodo post-parto tal y como describen Ubilla y Rebollar (1995) y Feugier y Fortun Lamothe (2006), independientemente del destete.

Tabla 2. Estado del ovario y resultados de la maduración *in vitro* de oocitos de conejas primíparas lactantes en de los grupos L25 (lactantes en el día 25 pp), L32 (lactantes en el día 32 pp) y NL32 (destetadas en día 25pp).

| | Día 25 pp | | Día 32 pp | |
|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--|
| | L25 | NL32 | L32 | |
| Nº de conejas | 10 | 13 | 11 | |
| Folículos (n) | | | | |
| $\geq 1\text{mm}$ | 12,7 \pm 1,58 ^b | 18,0 \pm 1,45 ^a | 17,6 \pm 1,67 ^a | |
| Hemorrágicos | 1,30 \pm 0,85 | 1,00 \pm 0,77 | 0,90 \pm 0,89 | |
| Poblaciones foliculares/ovario (n) | | | | |
| Antrales | 9,88 \pm 2,17 | 15,7 \pm 2,05 | 13,3 \pm 1,70 | |
| Preantrales | 12,9 \pm 3,6 | 19,3 \pm 3,36 | 10,4 \pm 2,80 | |
| Primarios | 10,8 \pm 3,32 | 13,4 \pm 3,13 | 10,4 \pm 2,61 | |
| Maduración <i>In vitro</i> | | | | |
| MII (%) | 67,0 ^b | 79,7 ^a | 78,3 ^{ab} | |
| GCs migrados o parcialmente migrados (%) | 16,0 ^b | 38,3 ^a | 60,0 ^a | |
| GCs no migrados (%) | 76,0 ^a | 46,8 ^b | 33,3 ^b | |
| GCs anormalmente migrados (%) | 8,0 | 14,9 | 3,3 | |

pp: post-parto. a,b: $P < 0,05$ en la misma fila; GCs Gránulos corticales; MII: metafase II

CONCLUSIONES

El destete temprano a los 25 dpp mejora las reservas energéticas de las conejas primíparas, pero este hecho no se ve reflejado a nivel ovárico, ya que el estado de las poblaciones foliculares y la calidad de los oocitos mejora el día 32 pp comparados con el día 25 pp, independientemente de si se ha realizado o no el destete previamente, por lo que éste se podría realizar más tarde.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado por la CICYT (AGL08-022283) y por la Comunidad de Madrid (S2009/AGR1704).

BIBLIOGRAFIA

- Arias-Álvarez M., López-Béjar M., Rebollar P.G., García-García R.M., Lorenzo P.L. 2007. Investigación Técnica Económica Agraria, 28, 42-44.
- Arias-Álvarez M., García-García R.M., Rebollar P.G., Revuelta L., Millán P., Lorenzo P.L., 2009. Theriogenol., 72, 612-623.
- Boletín Oficial del Estado. 2005. B.O.E. 252:34367-34391.
- Brecchia G., Bonanno A., Galeati G., Federici G., Maranesi M., Gobbetti A., Zerani M., Boiti C., 2006. Dom. Anim. Endocrinol., 31, 105-122.
- Castellini C., Dal Bosco A., Mugnai C., 2003. Livest. Prod. Sc., 83, 131-139.
- Castellini C., Dal Bosco A., Cardinali C., 2006. Reprod. Nutr. Dev., 46, 195-204.
- Diskin M.G., Mackey D.R., Roche J.F., Sreenan J.M., 2003. Anim. Reprod. Sc., 78, 345-370.
- Feugier A., Fortun-Lamothe L., 2006. Animal Research, 55, 459-470.
- Gidenne T., Lebas F., 2006. CABI publishing, Wallingford, UK, chapter 11, pp. 179-209.
- Kranzfelder D., Korr. H., Mestwerdt W., Maurer-Schultze B., 1984. Cell Tissue Research, 238, 611-620.
- Lorenzo P.L., Illera J.C., Silván G., Munro C.J., Illera M.J., Illera M., 1997. J.Reprod. Immunol., 35, 11-29.
- Parigi Bini R., Xiccato G., 1998. CABI publishing, Wallingford, UK, pp. 103-131.
- Pereda N., 2010. Tesis Doctoral. UPM. Madrid. Spain. 194 pp.
- Rebollar P.G., Bonanno A., Di Grigoli A., Tornambè G., Lorenzo P.L., 2008. Anim. Reprod. Sc., 104, 316-328.
- SAS/STAT, 1999-2001. SAS 7. STAT User's Guide (Release 8.2). SAS Inst. INC., Cary, NC.
- Ubilla E., Rebollar P.G., 1995. Anim. Reprod. Sc., 38, 337-344.
- Xiccato G., Trocino A., Sartori A., Queaque P.I., 2004. Livest. Prod. Sc., 16, 239-251.
- Xiccato G., Trocino A., Boiti C., Brecchia G., 2005. Anim. Sc., 81, 289-296.
- Yanagimachi R., 1994. Raven Press, 1994. P. 189-279.