



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Escuela Politécnica Superior de Orihuela

Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias, Alimentarias
y Agroambientales



Tesis doctoral

**SENSIBILIDAD AL ESTRÉS Y SUPERVIVENCIA EN DOS LÍNEAS
DE CONEJO SELECCIONADAS DIVERGENTEMENTE POR
VARIABILIDAD DEL TAMAÑO DE CAMADA AL PARTO**

IVÁN AGEA DURÁN

Directora: MARÍA JOSÉ ARGENTE CARRASCOSA

Codirectora: MARÍA DE LA LUZ GARCÍA PARDO



La presente Tesis Doctoral, titulada “**Sensibilidad al estrés y supervivencia en dos líneas de conejo seleccionadas divergentemente por variabilidad del tamaño de camada al parto**”, se presenta bajo la modalidad de tesis por compendio de las siguientes publicaciones:

1. Agea, I., García, M. D. L. L., y Argente, M. J. (2021). Preliminary study of body temperature emissivity in rabbits selected for litter size residual variability. *Agriculture*, 11(7), 604. <https://doi.org/10.3390/agriculture11070604>.
2. Agea, I., García, M. D. L. L., Blasco, A., Massányi, P., Capcarová, M., y Argente, M. J. (2020). Correlated response to selection for litter size residual variability in rabbits' body condition. *Animals*, 10(12), 2447. <https://doi.org/10.3390/ani10122447>.
3. Agea, I., García, M. L., Blasco, A., y Argente, M. J. (2019). Litter survival differences between divergently selected lines for environmental sensitivity in rabbits. *Animals*, 9(9), 603. <https://doi.org/10.3390/ani9090603>.

Publicación 1

Agea, I., García, M. D. L. L., y Argente, M. J. (2021). Preliminary study of body temperature emissivity in rabbits selected for litter size residual variability. *Agriculture*, 11(7), 604.

Publicado: 28 de junio de 2021.

DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture11070604>.

ISSN: 2077-0472.

Categoría de JCR	Cuartil	Rango	Factor de impacto
<i>Agronomy</i>	Q1	20 / 90	3,408

Publicación 2

Agea, I., García, M. D. L. L., Blasco, A., Massányi, P., Capcarová, M., y Argente, M. J. (2020). Correlated response to selection for litter size residual variability in rabbits' body condition. *Animals*, 10(12), 244.

Publicado: 21 de diciembre de 2020.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10122447>.

ISSN: 2076-2615.

Categoría de JCR	Cuartil	Rango	Factor de impacto
<i>Agriculture, dairy & animal science</i>	Q1	13 / 63	2,752

Publicación 3

Agea, I., García, M. L., Blasco, A., y Argente, M. J. (2019). Litter survival differences between divergently selected lines for environmental sensitivity in rabbits. *Animals*, 9(9), 603.

Publicado: 25 de Agosto de 2019.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ani9090603>.

ISSN: 2076-2615.

Categoría de JCR	Cuartil	Rango	Factor de impacto
<i>Agriculture, dairy & animal science</i>	Q1	10 / 63	2,323



Dña. María José Argente Carrascosa, Dra. en Ingeniería Agrónoma y Catedrática de Universidad de la Universidad Miguel Hernández de Elche

Dña. María de la Luz García Pardo, Dra. en Ingeniería Agrónoma y Catedrática de Universidad de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada “**Sensibilidad al estrés y supervivencia en dos líneas de conejo seleccionadas divergentemente por variabilidad del tamaño de camada al parto**”, de la que es autor el ingeniero agrónomo **D. Iván Agea Durán**, ha sido realizado bajo nuestra dirección y autorizamos a que sea presentada para optar a la obtención de Doctor por la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Y para que conste a los efectos oportunos se firma el presente certificado.

Firmado:

Dra. Dña. María José Argente Carrascosa
Directora

Dra. Dña. María de la Luz García Pardo
Codirectora



Dra. Dña. Juana Fernández López, Catedrática de Universidad y Coordinadora del Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias (ReTos-AAA) de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Sensibilidad al estrés y supervivencia en dos líneas de conejos seleccionadas divergentemente por variabilidad del tamaño de camada al parto**”, de la que es autor el ingeniero agrónomo **D. Iván Agea Durán**, ha sido realizada bajo la dirección de la **Dra. Dña. María José Argente Carrascosa** y la codirección de la **Dra. Dña. María de la Luz García Pardo**, actuando como tutora de la misma la **Dra. Dña. Esther Sendra Nadal**. Considero que la Tesis es conforme, en cuanto a forma y contenido, a los requerimientos del Programa de Doctorado ReTos-AAA, siendo por tanto apta para su exposición y defensa pública.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado.

Dra. Dña. Juana Fernández López
Coordinadora del Programa de Doctorado ReTos-AAA

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Departamento de Tecnología Agroalimentaria por acogerme como uno más y por la cercanía, colaboración y apoyo de sus integrantes.

Gracias a mi directora, María José Argente y codirectora, Marí Luz García, mis referentes, por su tranquilo liderazgo, su dedicación, esfuerzos, paciencia y amistad.

Dedico este trabajo a mi familia por el tiempo y presencia arrebatados, especialmente a Livia, por comprender y apoyar mi empeñamiento. Y a las niñas, Leire y Cloe, que nacieron en el albor de este trabajo y han crecido con él más de lo que ellas y yo hubiéramos querido.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	- 1 -
2. ABSTRACT	- 3 -
3. INTRODUCCIÓN	- 5 -
3.1. BIENESTAR ANIMAL	- 5 -
3.2. ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO	- 5 -
3.3. MARCADORES DE ESTRÉS AGUDO	- 7 -
3.4. MARCADORES DE ESTRÉS CRÓNICO	- 8 -
3.5. EFECTOS DEL ESTRÉS EN PRODUCCIÓN ANIMAL.....	- 11 -
3.6. EXPERIMENTOS DE SELECCIÓN PARA MEJORAR EL BIENESTAR EN CONEJO	- 12 -
4. OBJETIVOS	- 15 -
5. MATERIAL Y MÉTODOS	- 16 -
5.1. DECLARACIÓN ÉTICA	- 16 -
5.2. INSTALACIONES E INSTRUMENTAL	- 16 -
5.3. ANIMALES	- 16 -
5.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	- 17 -
5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	- 19 -
6. PUBLICACIONES	- 20 -
6.1. PUBLICACIÓN 1	- 20 -
6.2. PUBLICACIÓN 2	- 28 -
6.3. PUBLICACIÓN 3	- 37 -
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 47 -
8. CONCLUSIONES	- 52 -
9. BIBLIOGRAFÍA	- 53 -

1. RESUMEN

El bienestar animal surge como una preocupación en la producción ganadera, especialmente en la cría de animales para consumo humano. Esta preocupación se debe en parte a la creciente conciencia de los consumidores sobre las condiciones de vida de los animales y a la evidencia científica que vincula el bienestar animal con la calidad de la carne y la salud pública. Diversos estudios han demostrado que el bienestar animal no sólo es un asunto ético, sino que también tiene implicaciones económicas, al incidir sobre la productividad del animal. El bienestar animal se define como el estado físico y mental de un animal en relación con su entorno. Un animal con buen bienestar es capaz de hacer frente a las demandas de su entorno y exhibe comportamientos naturales. Estrés y bienestar son conceptos opuestos, y la producción animal debiera promover el bienestar de los animales y minimizar el estrés. El estrés surge cuando un animal percibe una amenaza o es incapaz de adaptarse a su entorno y causa daños a largo plazo en el sistema inmunológico, endocrino y reproductivo, por lo que tiene consecuencias negativas para la salud y el bienestar del animal. Los biomarcadores más comúnmente empleados para medir el nivel de estrés en el animal incluyen hormonas como el cortisol y la corticosterona, proteínas de fase aguda, y parámetros hematológicos. Además de estos indicadores bioquímicos, el estrés se manifiesta en cambios fisiológicos como el aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria y la elevación de la temperatura corporal. La termografía, una técnica no invasiva que mide la radiación infrarroja emitida por los cuerpos, ha surgido como una herramienta valiosa para evaluar el estrés en animales, permitiendo la medición continua de la temperatura corporal y la detección de patrones de respuesta al estrés en diversas especies.

El conejo es especialmente sensible al estrés. Alteraciones en la temperatura ambiental y el fotoperiodo, así como situaciones de estrés social, afectan al eje hormonal que regula la fertilidad, lo que resulta en una menor libido, una reducción de la calidad espermática, una disminución en la tasa de ovulación y un menor tamaño de las camadas. Además, el estrés disminuye la producción de leche, empeora el crecimiento y la calidad de la carne y aumenta la incidencia de estereotipias. Por tanto, el estrés crónico en conejos compromete su bienestar y tiene consecuencias económicas importantes para la producción cunícola. Para mejorar la adaptación al estrés en conejos, se han implementado diversas estrategias de selección genética. Una de ellas es la selección para resistencia a enfermedades, como la mixomatosis y la enteropatía mucoide, lo cual ha demostrado aumentar la supervivencia de los animales. Otra estrategia es la selección por longevidad y resiliencia. La longevidad se define como el número de partos de una coneja y se ha asociado a una mayor capacidad de adaptación del animal a diferentes ambientes. La resiliencia, por su parte, se relaciona con la capacidad del animal para mantener su rendimiento productivo frente a perturbaciones ambientales, y se ha medido a través de la uniformidad en el tamaño de la camada. En las instalaciones de la Escuela Politécnica

Superior de Orihuela (EPSO) se ha desarrollado un experimento de selección divergente por variabilidad del tamaño de camada en conejo. Las líneas de este experimento son el material animal de la presente tesis doctoral. La hipótesis de trabajo de esta tesis doctoral es que las conejas de la línea homogénea para el tamaño de camada al parto son más resistentes al estrés y tienen mayor supervivencia que las conejas seleccionadas por heterogeneidad para dicho carácter. Para evaluar la respuesta correlacionada de la selección por variabilidad del tamaño de camada al parto sobre la respuesta de la hembra al estrés y la supervivencia del gazapo durante la lactación, se propusieron 3 experimentos. En el primero, se estimaron las variaciones de temperatura corporal emitida por las conejas tras un estímulo estresante utilizando una cámara termográfica. Las conejas de la línea homogénea experimentaron su máximo de emisividad de temperatura antes que la línea heterogénea tras el estímulo estresante (5 min frente a 30 min). La intensidad de la emisividad de temperatura corporal de la línea heterogénea a los 30 min fue 0,96 °C mayor que la temperatura de la línea homogénea. En el segundo experimento se evaluó la gestión de las reservas corporales de las conejas en momentos productivos de alta demanda energética entre la segunda monta y el destete midiendo la condición corporal y el espesor de la grasa perirrenal mediante ecografías. Las conejas de la línea homogénea perdieron menos reservas grasas entre la monta y el parto y ganaron más reservas corporales entre el parto y los 10 días postparto, por lo que dispusieron de una mejor condición corporal para afrontar la lactación de sus gazapos. El espesor de la grasa perirrenal al parto en la línea homogénea fue de 7,71 mm por los 7,44 mm de la línea heterogénea ($P = 0,99$) y a los 10 días postparto, el espesor fue de 8,17 mm y 7,90 mm ($P = 0,99$), respectivamente. Por otro lado, en el tercer experimento se profundizó en la gestión de las reservas corporales de las conejas evaluando el peso individual de los gazapos hasta el destete y la distancia a la media de sus camadas como medida de homogeneidad en el crecimiento. En este caso, los gazapos de la línea homogénea al destete tuvieron menor distancia de sus pesos individuales a la media de sus camadas que los gazapos de la heterogénea (47,8 g y 54,1 g, respectivamente). En cuanto a la supervivencia, se cuantificó el tamaño de camada al parto en ambas líneas (8,3 gazapos en la homogénea y 7,7 en la heterogénea), la supervivencia al parto a los 4 días postparto y al destete. Las conejas de la línea homogénea tuvieron mayor tamaño de camada al destete como consecuencia de una mayor supervivencia (+ 5%; $P = 0,93$). En conclusión, la selección por homogeneidad en tamaño de camada puede ser una herramienta eficaz para mejorar la capacidad del animal de hacer frente a situaciones de altas demandas energéticas sin disminuir sus rendimientos productivos, y con ello ser método de selección válido para mejorar el bienestar del animal.

2. ABSTRACT

Animal welfare is emerging as a concern in livestock production, especially in food animal husbandry. This concern is partly due to growing consumer awareness of animal living conditions and scientific evidence linking animal welfare to meat quality and public health. Studies have shown that animal welfare is not only an ethical issue, but also has economic implications by affecting animal productivity. Animal welfare is defined as the physical and mental state of an animal in relation to its environment. An animal with good welfare is able to cope with the demands of its environment and exhibits natural behaviours. Stress and welfare are opposites, and animal production should promote animal welfare and minimise stress. Stress arises when an animal perceives a threat or is unable to adapt to its environment, and causes long-term damage to the immune, endocrine and reproductive systems, thus having negative consequences for animal health and welfare. The most used biomarkers to measure the level of stress in the animal include hormones such as cortisol and corticosterone, acute phase proteins, and haematological parameters. In addition to these biochemical indicators, stress manifests itself in physiological changes such as increased heart and respiratory rates and elevated body temperature. Thermography, a non-invasive technique that measures infrared radiation emitted by bodies, has emerged as a valuable tool for assessing stress in animals, allowing continuous measurement of body temperature and detection of stress response patterns in various species.

The rabbit is particularly sensitive to stress. Alterations in environmental temperature and photoperiod, as well as social stress situations, affect the hormonal axis that regulates fertility, resulting in lower libido, reduced sperm quality, lower ovulation rate and smaller litter size. In addition, stress decreases milk production, worsens growth and meat quality, and increases the incidence of stereotypies. Chronic stress in rabbits therefore compromises their welfare and has important economic consequences for rabbit production. To improve adaptation to stress in rabbits, several genetic selection strategies have been implemented. One of them is selection for resistance to diseases, such as myxomatosis and mucoid enteropathy, which has been shown to increase animal survival. Another strategy is selection for longevity and resilience. Longevity is defined as the number of parturitions of a doe and has been associated with an animal's increased ability to adapt to different environments. Resilience, on the other hand, is related to the animal's ability to maintain its productive performance in the face of environmental perturbations and has been measured through litter size uniformity. In the facilities of the Polytechnic School of Orihuea (EPSO), an experiment of divergent selection for variability in litter size has been carried out. The lines of this experiment are the animal material of this thesis. The working hypothesis of this thesis is that rabbits from the homogeneous line for litter size at parturition are more resistant to stress and have higher survival than rabbits selected for heterogeneity for litter size at parturition. To evaluate the correlated response of selection for litter size variability at parturition on the female's response to

stress and survival of the doe during lactation, three experiments were proposed. In the first, variations in body temperature emitted by rabbits following a stressful stimulus were estimated using a thermographic camera. The rabbits in the homogeneous line experienced their maximum temperature emissivity earlier than the heterogeneous line after the stressful stimulus (5 min vs. 30 min). The intensity of the body temperature emissivity of the heterogeneous line at 30 min was 0.96 °C higher than the temperature of the homogeneous line. In the second experiment, the mobilisation of energy reserves of the rabbits at critical times between the second mating and weaning was assessed by measuring body condition and perirenal fat thickness by ultrasound. Rabbits of the homogenous line lost less fat reserves between mating and parturition and gained more body reserves between parturition and 10 days postpartum, thus having a better body condition to cope with the lactation of their rabbits. Perirenal fat thickness at parturition in the homogenous line was 7.71 mm compared to 7.44 mm in the heterogeneous line ($P = 0.99$) and at 10 days postpartum, the thickness was 8.17 mm and 7.90 mm ($P = 0.99$), respectively. On the other hand, in the third experiment, the use of the rabbits' body reserves was further explored by evaluating the individual weaning weights and the distance to the mean of their litters as a measure of homogeneity in growth. In this case, rabbits from the homogeneous line at weaning had smaller distance of their individual weights to the mean of their litters than rabbits from the heterogeneous line (47.8 g and 54.1 g, respectively). In terms of survival, litter size at parturition was quantified for both lines (8.3 g in the homogenous and 7.7 g in the heterogeneous), survival to parturition at 4 days postpartum and at weaning. Rabbits from the homogenous line had larger litter size at weaning as a consequence of higher survival (+ 5%; $P = 0.93$). In conclusion, selection for homogeneity in litter size can be an effective tool to improve the animal's ability to cope with high energy demands without decreasing productive performance, and thus be a valid selection method to improve animal welfare.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. BIENESTAR ANIMAL

El bienestar animal es uno de los aspectos de la producción ganadera que cada vez más preocupa a los consumidores. Luske y Viane (2000) preveían que el bienestar animal se convertiría en un tema crítico, especialmente en el ámbito de la cría de animales para producción de carne y, Lusk y Norwood (2011) también afirmaban que era un tema de interés para la producción agrícola. Se han desarrollado prácticas de gestión y tecnologías de cría de ganado para facilitar la adaptación del animal a los cambios en el sistema de producción. Particularmente la selección genética puede ayudar a mejorar el comportamiento social del ganado y disminuir la susceptibilidad a enfermar y al estrés del animal (Brito *et al.*, 2020). La Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) define el bienestar animal como “*el estado físico y mental de un animal en relación con las condiciones en las que vive y muere*” (www.woah.org). Sin embargo, la definición más empleada es la de Broom (1988), quien define de forma más sencilla el bienestar como el estado de un animal cuando hace frente a su entorno. Según Curtis *et al.* (2007), la mejor medida e indicador del bienestar de los animales de granja serían los índices de rendimiento productivo y reproductivo de un animal en relación con su potencial previsto.

El estado de bienestar de un animal se puede ver alterado por situaciones de estrés. El estrés surge cuando las demandas ambientales exceden la capacidad de adaptación del organismo, sobre todo cuando el animal percibe una determinada situación como impredecible y poco controlable (Manteca *et al.*, 2013). El bienestar y el estrés son conceptos estrechamente relacionados, pero opuestos, ya que el bienestar no se puede lograr bajo estrés y viceversa (Etim *et al.*, 2014).

3.2. ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO

El estrés es un estado en el que los animales ven amenazada su homeostasis, respondiendo con cambios de comportamiento, fisiológicos y neurológicos con los que tratan de recuperar su estado inicial, por lo que la exposición al estrés puede llegar a comprometer el bienestar del animal (Dobson *et al.*, 2001). Sin embargo, no todas las situaciones en las que el bienestar animal se ve alterado se deberían considerar estresantes. Por ejemplo, se ha observado que cierto grado de exposición a un estresor puede ser beneficioso para el animal. En este sentido, Heiming *et al.* (2009) encontraron que los individuos que se criaron en un entorno social amenazante se desempeñaron significativamente mejor como adultos cuando se enfrentaron a situaciones sociales amenazantes que los animales que se criaron en un entorno social estable. Además, si fueron las madres las que se encontraban en un entorno amenazante durante la gestación y la lactancia, el comportamiento de su descendencia se desarrolló adaptado a enfrentar ese entorno adverso.

El estrés por calor es una barrera importante en la producción ganadera sostenible (Most y Yates, 2021). Existen experiencias en conejo en las que se demuestra que someter a los gazapos en edad temprana a estrés térmico puntual, induce la capacidad de tolerar la exposición al calor con posterioridad (Ezzat *et al.*, 2019; Madkour *et al.*, 2021). Según Sakr *et al.* (2019) se puede aclimatar a los animales a ciertas condiciones ambientales, habiéndolos sometido previamente a un estresor del mismo tipo. En su experimento demostraron que las conejas que habían sido aclimatadas a condiciones elevadas de temperatura ambiente tuvieron una menor mortalidad, sus camadas fueron mayores al parto, tuvieron una menor mortalidad en lactación y un mayor peso al destete. Además, encontraron un mejor comportamiento de las constantes vitales, del perfil hematológico y bioquímico de las conejas con el tratamiento previo al estresor. También, se ha observado que la exposición a patógenos en etapas tempranas de la vida de la coneja puede ayudar a su sistema inmunitario y aumentar su productividad (Savietto *et al.*, 2019).

Por ello, el término estrés debería restringirse a las condiciones en las que una demanda ambiental supera la capacidad reguladora natural de un organismo, en situaciones particulares que incluyen la imprevisibilidad y la ausencia de control (Koolhaas *et al.*, 2011). Bajo esas circunstancias, el estrés impide que los animales expresen todo su potencial genético (Dobson *et al.*, 2001).

El estrés afecta en diferente magnitud al bienestar animal en función de la intensidad en que se presenta el agente estresante (estresor) y de su duración. En relación con la intensidad del estresor y la recuperación del animal, hay autores que indican que ésta se caracteriza por una recuperación reducida independientemente de la magnitud del estresor (Koolhaas *et al.*, 2011), mientras que otros, como Dobson *et al.* (2001), encuentran que, a mayor severidad del estímulo de estrés, mayor es el efecto perjudicial sobre el carácter productivo. En cualquier caso, cuanto más esfuerzo tenga que realizar un animal para afrontar situaciones de estrés, peor será su bienestar (Kanis *et al.*, 2004).

Con relación a la duración de la exposición al agente estresante, el estrés se puede clasificar en agudo o crónico. El estrés agudo surge como reacción a una exigencia o presión puntual y normalmente desaparece con rapidez, de minutos a horas (Dhabhar, 2000). Este tipo de estrés ocasiona efectos más o menos importantes en función de la gravedad del suceso estresante, pero permite una recuperación rápida y bastante completa del equilibrio fisiológico (Trevisi y Bertoni, 2009). Uno de estos efectos sería la pérdida de peso del animal ante la inhibición de la ingesta de alimentos (Harris, 2015). La magnitud de la pérdida de peso y el tiempo que dura la inhibición de la ingesta está relacionado directamente con la intensidad y la duración del estresor (Tabarin *et al.*, 2007; Dal-Zotto *et al.*, 2004).

El estrés crónico ocurre cuando la situación estresante se prolonga en el tiempo de días a meses (Dhabhar, 2000), de manera que el animal ha de convivir con el estresor. En las situaciones de estrés prolongado en el tiempo, se ha observado que éste ocasiona la

liberación sostenida de catecolaminas que puede inducir la constricción del sistema vascular coronario en conejos, lo que resulta en una miocardiopatía isquémica. El estrés crónico potencia la hiperlipidemia en conejos (Yu *et al.*, 2017) al tiempo que genera una respuesta inflamatoria en las arterias (Black y Garbutt, 2002), llegando a provocar aterosclerosis (Yu *et al.*, 2018). Por lo que generalmente con una situación de estrés crónico, los animales desarrollan una serie de patologías o incluso la muerte (Harris, 2015).

3.3. MARCADORES DE ESTRÉS AGUDO

Los marcadores de estrés agudo son indicadores fisiológicos y bioquímicos que habitualmente se miden en sangre, aunque algunos de ellos también se pueden medir en orina y heces. Los marcadores de estrés más típicos son el cortisol y la corticosterona que, en caso de estrés, presentan mayores concentraciones (Sakr *et al.*, 2019). También, las proteínas de la fase aguda como la proteína C-reactiva, el complemento C3 o la HSP70, junto con los parámetros hematológicos de concentración de neutrófilos, de linfocitos y la ratio neutrófilos / linfocitos son algunos de los biomarcadores clásicos de estrés (Ferrian *et al.*, 2013; García-Quirós *et al.*, 2014; Argente *et al.*, 2019; Gunia *et al.*, 2019; Sakr *et al.*, 2019). Más recientemente, la bilirrubina y algunos lípidos y proteínas en sangre, relacionados con el metabolismo de las grasas, han sido empleados como biomarcadores de estrés en el animal (Argente *et al.*, 2019).

Por otro lado, el estrés puede afectar a las constantes vitales, incluyendo la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria y la temperatura corporal. El aumento de la frecuencia cardíaca se ha relacionado con la activación del sistema nervioso simpático, que prepara al cuerpo para la respuesta de "lucha o huida" (Walker y Carrive, 2003). Como resultado, el corazón late más rápido y la frecuencia cardíaca se acelera. Respecto al aumento de la frecuencia respiratoria bajo situaciones de estrés, esto se debe a la necesidad de suministrar más oxígeno al cuerpo para hacer frente a la situación estresante. La respiración se vuelve más rápida y superficial, y aumenta el número de respiraciones por minuto (Marai *et al.*, 2007; Villalba-Caloca *et al.*, 2020). Finalmente, en relación con el incremento de la temperatura corporal bajo estrés, la medición convencional de la temperatura corporal se realiza generalmente con un termómetro rectal o de oído (Marai *et al.*, 2001), a lo que se ha sumado el uso de la termografía (Stewart *et al.*, 2005; Unruh *et al.*, 2017; Jaén-Téllez *et al.*, 2020). La ventaja de la termografía frente a las otras técnicas radica en que puede medirse la temperatura con una menor manipulación de los animales y que las cámaras termográficas permiten tomar, además de imágenes termográficas, la medición continua de la temperatura y la grabación de vídeo termográfico. La termografía ha ayudado a estudiar cómo los conejos elevan su temperatura corporal en situaciones de estrés, tomando mediciones en oreja, ojo y nariz (de Lima *et al.*, 2013; Jaén-Téllez *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2022).

3.4. MARCADORES DE ESTRÉS CRÓNICO

La mortalidad es la consecuencia última de falta de bienestar, especialmente en situaciones de estrés crónico (Broom, 2007). Por ello los marcadores de estrés crónico se han relacionado con medidas interconectadas con la supervivencia del animal (Bruijnis *et al.*, 2013), entre ellos la robustez y la resiliencia (Saviotto *et al.*, 2015; Argente *et al.*, 2019; Heuß *et al.*, 2019; Peixoto-Gonçalves *et al.*, 2023).

La robustez está relacionada con una menor sensibilidad al estrés y las enfermedades (Belloumi *et al.*, 2021) y representa la capacidad de un animal de mantener su estado de bienestar frente a un cambio ambiental (Mormède *et al.*, 2011). En el ámbito productivo, la podemos entender como la capacidad de mantener su producción aún en condiciones ambientales adversas (Friggens *et al.*, 2017). Por tanto, los animales más robustos serán menos sensibles al estrés y presentarán un mayor estado del bienestar.

Según Knap (2005), la robustez se puede implementar como un carácter objetivo de mejora aunque, al tener una baja heredabilidad, requiere de una inversión sustancial en datos y en tecnología. Además, muchos de los caracteres asociados a la robustez (tolerancia al calor, resistencia a enfermedades, número de camadas durante la vida productiva, o tasa de supervivencia en crecimiento) también tienen heredabilidades bajas ($h^2 \leq 0,1$). A pesar de ello, Herrero-Medrano *et al.* (2015) apuntan a que la selección de animales sin tener en cuenta su robustez puede ocasionar que los animales tengan dificultades en manifestar su potencial productivo en ambientes no ideales, y que sea económicamente relevante incluirla como objetivo de selección.

En general, la robustez se puede considerar compuesta por múltiples componentes que se ponderan adecuadamente según su valor de idoneidad en un entorno y sistema de producción determinados (Friggens *et al.*, 2017). La longevidad funcional es un indicador directo de la robustez de las hembras (El Nagar *et al.*, 2021) y un aspecto primordial de la sostenibilidad de la producción de carne de conejo. Representa la capacidad acumulativa de un animal para superar obstáculos ambientales que ha enfrentado a lo largo de su vida (Friggens *et al.*, 2017). Es un carácter que se ha empleado con frecuencia para medir la robustez. Según Yazdi *et al.* (2000) hay suficiente variabilidad genética para que, a pesar de su baja heredabilidad, sea recomendable incluir la longevidad funcional en los programas de selección genética, dado el beneficio económico que supone para el productor. Por ejemplo, Theilgaard *et al.* (2009) encontraron que una línea de conejos seleccionada por longevidad tenía mayor robustez que una línea seleccionada por tamaño de camada al destete. Esta mayor robustez se manifestó como un mayor peso vivo al destete (+ 128 g), mayor espesor de grasa perirrenal (+ 0,47 mm) y mayor energía corporal estimada (+ 0,29 MJ/kg).

La resiliencia es la capacidad de un animal para verse mínimamente afectado o para volver rápidamente al estado en el que se encontraba antes de la exposición a una

perturbación ambiental o enfermedad (Berghof *et al.*, 2019a; Knap y Doeschl-Wilson, 2020). Resulta difícil medir la resiliencia general, por lo que usualmente se ha medido la resiliencia a enfermedades de forma particular (Berghof *et al.*, 2019a). La resiliencia a enfermedades está condicionada por la tolerancia y la resistencia frente a patógenos. La tolerancia se define como la capacidad de un animal de limitar la carga de patógenos y la resistencia como la capacidad de un animal infectado de limitar el daño causado por la carga de patógenos (Knap y Doeschl-Wilson, 2020). Mulder y Rashidi (2017) demostraron que la selección basada en la resiliencia es una forma pragmática de aumentar la resistencia a las enfermedades y a la tolerancia a las infecciones. Sin embargo, los resultados de la selección por resiliencia a enfermedades pueden verse afectados por otros factores como el estrés por calor (Bloemhof *et al.*, 2008) o la estacionalidad (Sevillano *et al.*, 2016). De hecho, Doeschl-Wilson *et al.* (2012) consideraron que estimar la tolerancia a patógenos infecciosos es complejo porque requiere de múltiples mediciones por individuo y que es necesario medir diferentes variables. También Taghipoor *et al.* (2023) aseguran que la resiliencia es un carácter difícil de medir directamente y que requiere modelos matemáticos con parámetros biológicamente significativos para obtener indicadores cuantitativos. En este sentido, Elgersma *et al.* (2018) proponen que se considere la variabilidad en el rendimiento productivo para facilitar la cría de animales más resistentes y fáciles de manejar.

Colditz y Hine (2016) propusieron una serie de variables que pueden evaluar la resiliencia global de un animal en su conjunto. Éstas fueron la temperatura corporal, la frecuencia cardíaca, la normalidad del ritmo circadiano, la ingesta de alimento, la variable de producción principal de la especie en cuestión, la respuesta inmunológica a las vacunas, la normalidad del comportamiento general, la velocidad de adquisición de comportamientos predictivos relacionados con señales ambientales positivas y la normalidad de las vocalizaciones.

En cualquier caso, Berghof *et al.* (2019b) proponen la combinación de diferentes indicadores de resiliencia en un índice de selección, entre los que estaría la homogeneidad en los caracteres productivos.

La homogeneidad en los caracteres productivos está relacionada con un mejor estado de salud de los animales (Poppe *et al.*, 2020). Diversos autores coinciden en utilizar la homogeneidad de caracteres como el tamaño de camada, el peso o la condición corporal como indicadores de resiliencia (en conejo, Blasco *et al.*, 2017; en vacuno, Poppe *et al.*, 2020 y Abdelkrim *et al.*, 2021; en ratón, Gutiérrez *et al.*, 2022).

La condición corporal ha sido comúnmente utilizada como indicador de bienestar por su relación con la fertilidad y la prevención de enfermedades, que son componentes de la resiliencia global. Según Bonanno *et al.* (2008) las conejas con una condición corporal intermedia, evaluada mediante palpación de lomo y cuartos traseros, tienen una mayor fertilidad (84,9%) que las conejas con una condición corporal pobre (52,0%) y que las

consideradas anchas de lomo y de cuartos traseros (58,6%). Existe una relación lineal y negativa entre la tasa de ovulación y el espesor de la grasa perirrenal (García *et al.*, 2021a), que es un indicador de la condición corporal de las conejas (Pascual *et al.*, 2000a). Según García *et al.* (2021a), existe una relación cuadrática entre el peso corporal en el momento de la monta y la tasa de ovulación, lo que indica que la pérdida de peso o el sobrepeso tienen un efecto negativo en la tasa de ovulación. Por su parte, Sánchez *et al.* (2012) hallaron que las conejas sanas tuvieron un índice de condición corporal, medido en una escala de 1 a 9, de $0,6 \pm 0,01$ unidades más que las enfermas. Existen otros estudios que llegan a conclusiones similares con respecto a la condición corporal en otras especies, como los de Barletta *et al.* (2017) en vacuno y Van Staaveren *et al.* (2017) en porcino.

Berghof *et al.* (2019b) mostraron que existe una variación genética en los indicadores de resiliencia basados en las desviaciones del peso corporal que abre posibilidades para mejorar la resiliencia mediante la selección genética. De hecho, Bengtsson *et al.* (2022) afirman que conviene incluir la condición corporal como indicador de resiliencia en los objetivos de mejora.

Gorsen *et al.* (2023) estudiaron la heredabilidad de las desviaciones del peso vivo, consumo de alimento y comportamiento alimentario en cerdos como caracteres indicadores de resiliencia. Hallaron que la heredabilidad era de baja a moderada para las desviaciones en el peso corporal (0,029 – 0,202), en el consumo de alimento (0,094 – 0,233) y en el comportamiento alimentario (0,162 – 0,283). Por su parte, Sánchez-Molano *et al.* (2020), en un estudio realizado sobre ovejas escocesas, estimaron diferentes porcentajes de integración de la resiliencia frente a cambios de temperatura ambiental en los programas de mejora, considerada como estabilidad en el crecimiento. Encontraron que se consigue reducir la pérdida de crecimiento que produciría el cambio en la temperatura ambiental tanto en ovejas como en corderos al destete, aun cuando sólo se considere un peso de la resiliencia del 10% en el índice de selección.

Argente *et al.* (2019) hallaron que la selección por homogeneidad del tamaño de camada al parto conseguía animales con menor concentración de marcadores de inflamación en estado basal, como concentración de linfocitos, proteína C reactiva, complemento C3 y bilirrubina que los animales seleccionados por heterogeneidad para ese carácter. Además, tras someter a ambos grupos de animales al estímulo estresante de la vacunación frente a enfermedad hemorrágica vírica o mixomatosis, los animales de la línea de homogénea presentaron un mayor incremento en la concentración de estos marcadores, lo que induce una mejor respuesta inmunitaria. Estos hallazgos tienen correspondencia con que la línea seleccionada por homogeneidad del tamaño de camada presentaba una mayor tasa de supervivencia de sus camadas (+ 4,1%) y menor tasa de eliminación no deseada (- 12,4%), lo que se relaciona con una mayor resiliencia.

3.5. EFECTOS DEL ESTRÉS EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Independientemente, de la naturaleza del agente estresor, éste produce cambios fisiológicos en los animales que interrumpe el funcionamiento correcto del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, que controla el equilibrio hormonal de la fertilidad (Marai *et al.*, 2002; Daader *et al.*, 2016), afectando negativamente tanto a la libido y la calidad espermática en los machos (Turner y Lysiak, 2008; Mahrose *et al.*, 2010; Cruz-Bacab *et al.*, 2018; Fadl, 2020; Fernández-Novo *et al.*, 2020) como a la tasa de fecundación, la supervivencia y el desarrollo embrionario y la producción de leche en las hembras (Pascual *et al.*, 2000b; Oladimeji *et al.*, 2022). En conejo, García-Tomás *et al.* (2008) encontraron que, por debajo de la temperatura de confort para conejos (21 °C), el estrés por frío provocó un menor volumen de eyaculado y mayor presencia de espermatozoides aglutinados, carbonato de calcio y espermatozoides muertos. Por encima de la temperatura ambiental de confort, Huang *et al.* (2023) hallaron que los conejos sometidos a estrés por calor producían eyaculados de menor volumen (0,77 mL \pm 0,29 vs. 0,96 mL \pm 0,34), menor tasa de motilidad espermática (80,16% \pm 8,94 vs. 88,55% \pm 5,55) y mayor porcentaje de espermatozoides con malformaciones (16,11% \pm 2,26 vs. 12,56% \pm 1,72) que conejos en condiciones de temperatura de confort. También García y Argente (2017) encontraron en conejo un efecto negativo del estrés térmico tanto en la tasa de ovulación (- 1 óvulo) como en la embriogénesis, con un menor porcentaje de embriones normales (- 14%) y un mayor espesor de la zona pelúcida (+ 1,2 μ m) a 24 y 48 horas post-coito. Este efecto persiste hasta el parto, tal y como indican Marco-Jiménez *et al.* (2017). Estos autores encontraron que las camadas de conejas alojadas en un rango de temperatura entre 25 y 36 °C tenían tamaños de camada inferiores en más de un gazapo por parto y mortalidad al nacimiento de hasta un 15,5% mayor que las conejas alojadas entre 14 y 20 °C. También la producción de leche de la coneja ve mermada su cantidad y calidad por el estrés térmico según diferentes autores (Maertens *et al.*, 2006; Pascual *et al.*, 2000b). En este sentido, Rafai y Papp (1984) encuentran que la producción de leche disminuye en 7,7 g/día por cada 1 °C que la temperatura ambiental sube por encima de 20 °C. Si la temperatura mínima no baja de 24 °C, la producción de leche se reduce en un 17,3% comparada con la producción de conejas que se mantienen por debajo de 24 °C (Pascual *et al.*, 1996). Maertens *et al.* (2006) encontraron que el impacto sobre la producción de leche es especialmente perjudicial si la temperatura nocturna es mayor a 25 °C. En este sentido, Szendrő *et al.* (1999) hallaron que la producción de leche era un 29% menor en conejas mantenidas a temperatura ambiental de 30 °C comparada con la producción de leche de conejas alojadas a 23 °C (114 g/día frente a 161 g/día). Este efecto negativo de la temperatura en la producción de leche concuerda con los resultados de Pascual *et al.* (2000b), que observaron que la producción de leche se reduce entre un 30 y un 40% si las conejas se mantienen a temperatura ambiental de 30 °C comparada con las conejas alojadas en condiciones de temperatura de confort. También el número de horas de luz al día puede ser un estímulo estresante con consecuencias en la reproducción del animal. En este contexto, la bibliografía apunta a que los días cortos tienen un efecto favorable sobre

la actividad sexual, mientras que los días largos tienen efectos positivos tanto en el macho, incrementando el volumen de los testículos, el número total de espermatozoides y el número de espermatozoides vivos por eyaculado, la motilidad y la concentración de espermatozoides, como en la hembra, incrementado la ovulación, la tasa de fecundación, el tamaño de camada, la producción de leche y la supervivencia pre destete (Marai *et al.*, 2004; Marai *et al.*, 2007; Matics *et al.*, 2013; Szendrő *et al.*, 2016). Adicionalmente, se ha encontrado una menor concentración de cortisol en sangre a la monta encontrado en animales bajo un fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 de oscuridad ($5,6 \text{ ng/mL} \pm 0,4$) en comparación con los sometidos a un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad ($7,5 \text{ ng/mL} \pm 0,4$) (Marai *et al.*, 2007).

Diversos autores han señalado que el estrés afecta negativamente a los caracteres de crecimiento. Aslani *et al.* (2014), Yu *et al.* (2018), Prims *et al.* (2019) y Alexa *et al.* (2023) encontraron que el estrés empeora el peso vivo en casi un 30% y la ganancia media diaria de peso con respecto a poblaciones de animales control. Otros autores han encontrado también que tanto la ingesta diaria de pienso como el índice de conversión, se ven afectados negativamente por diferentes fuentes de estrés (Maertens y Van Herck, 2000; Szendrő y Dalle Zotte, 2011; Matics *et al.*, 2018; Jaén-Téllez *et al.*, 2021). Se han encontrado así reducciones en el consumo diario de pienso de hasta 16 g/día menos en conejos estresados que en conejos control y aumentos de 0,23 en el índice de conversión durante el engorde.

Además, el estrés también compromete la calidad de la carne. El rendimiento a la canal es menor en conejos estresados socialmente que en conejos control en un 1% aproximadamente (Matics *et al.*, 2018). El pH de la carne también se ve afectado (Miranda de la Lama *et al.*, 2021), puesto que, a 45 min tras el sacrificio, las canales de animales que han sido transportados a matadero en condiciones de estrés tienen un pH más bajo ($6,08 \pm 0,24$) que las canales de animales transportados con menos estrés ($6,24 \pm 0,24$).

Finalmente, otro aspecto negativo del estrés es la aparición de estereotipias que a su vez puede afectar los rendimientos productivos de los animales, aunque al respecto la literatura es contradictoria (Williams y Randle, 2017; Tatemoto *et al.*, 2019).

3.6. EXPERIMENTOS DE SELECCIÓN PARA MEJORAR EL BIENESTAR EN CONEJO

El bienestar animal está directamente relacionado con la adaptación del animal tanto a los cambios de manejo o de alimentación como a la exposición a altas temperaturas o agentes patógenos. Disminuir la sensibilidad a estos desafíos ambientales ayudaría a mejorar el bienestar del animal. Se han propuesto diversas estrategias en el conejo para mejorar la adaptación del animal a los desafíos ambientales a los que puede verse expuesto durante su vida reproductiva. Entre estas estrategias estaría la mejora de la resistencia a

enfermedades o a trastornos digestivos, como el experimento de selección para la resistencia al virus de la mixomatosis llevado a cabo en Australia con 4 cepas del virus, donde se observó un incremento en la supervivencia de los animales entre 1955 y 1967 del 50 al 80% para la cepa menos virulenta y del 10 al 20% para la cepa más virulenta del virus (Sobey, 1969), y con el experimento de selección divergente para la enteropatía mucoide llevado a cabo en el Institute National De La Recherche Agronomique (INRA) de Toulouse, donde se observó una mortalidad acumulada menor en los animales resistentes que en los sensibles tras la inoculación con la cepa enteropatógena de *Escherichia coli* 0103 (Garreau *et al.*, 2012).

La selección por longevidad y resiliencia han sido las otras dos estrategias empleadas para mejorar la adaptación del animal al medio ambiente. La longevidad se ha medido como el número de partos o de inseminaciones que una coneja puede tener en una granja antes de ser eliminada por motivos de salud o productivos (Sánchez *et al.*, 2008; Larzul *et al.*, 2014). Sin embargo, la longevidad es un carácter difícil de seleccionar porque registrar la longevidad requiere mucho tiempo a menos que se utilicen datos censurados, pero los datos censurados son difíciles de analizar y, además, la heredabilidad de la longevidad es muy baja (El Nagar *et al.*, 2020; García *et al.*, 2021b; Piles *et al.*, 2021). También, la resiliencia es difícil de seleccionar por su baja heredabilidad (Hill y Mulder, 2010). En especies prolíficas como el conejo, la variabilidad residual del tamaño de camada dentro de hembra se ha relacionado con la sensibilidad ambiental o la capacidad de la hembra a adaptarse a los cambios del ambiente (Blasco *et al.*, 2018) y, por tanto, disminuir la variabilidad residual del tamaño de camada daría lugar a reproductoras más resilientes. También la homogeneidad del peso de la camada al nacimiento ha sido utilizada como una medida de la adaptación del animal (Bolet *et al.*, 2007).

En la actualidad, hay una línea materna seleccionada por longevidad (LP) en la Universitat Politècnica de València (UPV) y un experimento de selección divergente por longevidad en el INRA de Toulouse. La línea LP de la UPV se fundó seleccionando hembras de granjas comerciales que presentaban una larga carrera reproductiva (entre 25 y 41 partos) y cuya prolificidad oscilaba entre 7,5 y 11,9 gazapos vivos al parto (Sánchez *et al.*, 2008). La comparación entre la línea LP y una línea comercial maternal estándar como la línea V, seleccionada por tamaño de camada al destete después de 31 generaciones, mostró que la línea LP tuvo un 30% menos de probabilidad de ser eliminada de la explotación (Sánchez *et al.*, 2008) y una productividad similar a partir del cuarto parto que la línea V (Theilgaard *et al.*, 2007). En estudios posteriores, se ha constatado la capacidad de la línea LP para mantener una elevada capacidad reproductiva en diferentes ambientes sin necesidad de movilizar sus reservas corporales (Theilgaard *et al.*, 2009; Savietto *et al.*, 2013, 2015). Además, de mostrar una mayor respuesta inmunitaria ante situaciones de estrés térmico por calor (Ferriani *et al.*, 2012) e inoculación de agentes patógenos como el virus hemorrágico que la línea materna A (Belloumi *et al.*, 2021). Este resultado estaría de acuerdo con una mayor capacidad de la línea LP para abordar desafíos

térmicos e infecciosos (Ferran *et al.*, 2013), y por tanto estos animales mostraría una mayor robustez y una menor sensibilidad ambiental. En el experimento de selección divergente por longevidad del INRA de Toulouse, la longevidad se registró como el número total de inseminaciones artificiales después del primer parto (Larzul *et al.*, 2014). El número de camadas por hembra fue mayor en la línea de alta longevidad que en la línea de baja longevidad. Debido a esta diferencia entre las líneas, el número total de nacidos vivos y destetados por hembra fue mayor en la línea alta (Garreau *et al.*, 2017). En este experimento, la línea de alta longevidad mostró una mayor acumulación de reservas corporales al comienzo de la vida reproductiva que la línea baja y, mantuvo esta superioridad hasta el tercer parto.

Respecto a la selección por resiliencia, se han llevado a cabo dos experimentos de selección divergente por uniformidad en el peso de la camada al nacimiento en el INRA de Toulouse y por uniformidad en el tamaño de camada al nacimiento en la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH). En el experimento del INRA, el criterio de selección fue la desviación estándar del peso al nacimiento dentro de la camada (Garreau *et al.*, 2008; Bodin *et al.*, 2010a) utilizando las estimas de un modelo heteroscedástico (San Cristóbal-Gaudy *et al.*, 1998). Las desviaciones estándar del peso al nacimiento dentro de la camada fueron de 7,34 g en la línea homogénea y de 11,26 g en la línea heterogénea después de 10 generaciones de selección (Bodin *et al.*, 2010b). Además, la línea homogénea mostró menor mortalidad al nacimiento y al destete y mayor tamaño de camada al destete que la línea heterogénea. En el experimento de la UMH, la selección se basó en la varianza fenotípica del tamaño de la camada al nacimiento dentro de hembra después de ser corregido por el estado fisiológico de la hembra y el año-estación. Se trata del primer experimento en el que la selección se ha realizado directamente sobre la varianza ambiental, tratándola como un carácter observado. La selección tuvo éxito, mostrando la línea heterogénea una mayor variabilidad del tamaño de la camada (4,4 gazapos²) que la línea homogénea (2,7 gazapos², Blasco *et al.*, 2017) después de 10 generaciones de selección. Las líneas difieren en la respuesta inflamatoria y la respuesta corticotrópica al estrés, que son dos componentes importantes de adaptación fisiológica a desafíos ambientales como infecciones, lo que sugiere que la línea homogénea es más resiliente (Argente *et al.*, 2019; Beloumi *et al.*, 2020). Por otra parte, la línea homogénea muestra mayores reservas corporales en forma de grasa perirrenal en el parto (+ 0,23 mm) y a los 10 días tras el parto (+ 0,28 mm), por lo que la línea homogénea podría afrontar mejor las situaciones de alta demanda energética (García *et al.*, 2019). Estos resultados concuerdan con que la línea homogénea tenga una menor incidencia de problemas reproductivos (- 7%), una menor tasa de eliminación no deseada (- 12,4%) y una mayor tasa de supervivencia al parto (+ 2,9%) que la línea heterogénea (Argente *et al.*, 2019).

4. OBJETIVOS

El objetivo principal de la tesis es evaluar la respuesta correlacionada de la selección por variabilidad del tamaño de camada al parto sobre la respuesta de la hembra al estrés y la supervivencia de la camada.

Los objetivos específicos son:

- Estimar la respuesta correlacionada de la selección divergente por variabilidad del tamaño de camada en la emisividad de temperatura corporal.
- Estimar la respuesta correlacionada de la selección divergente por variabilidad del tamaño de camada en la condición corporal y la movilización de reservas corporales.
- Estimar la respuesta correlacionada de la selección divergente por variabilidad del tamaño de camada en la supervivencia de los gazapos al parto y al destete.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. DECLARACIÓN ÉTICA

Todos los procedimientos experimentales con animales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Miguel Hernández de Elche (Número de referencia 2019/VSC/PEA/0017), de conformidad con las Directivas del Consejo 98/58/EC y 2010/63/EU.

5.2. INSTALACIONES E INSTRUMENTAL

Los estudios llevados a cabo durante este proyecto se han realizado en las instalaciones de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO), de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH). Los animales se han alojado en la granja docente y de investigación de conejos de la EPSO, donde se han llevado a cabo las termografías y las ecografías, y se han recogido los datos productivos de este estudio.

El material inventariable que ha sido necesario para la obtención o procesado de datos ha consistido en una cámara termográfica, un ecógrafo y una báscula con las siguientes especificaciones:

- Cámara termográfica FLIR SC660[®] y programa ThermaCAM Researcher Pro 2.10[®], con precisión de ± 1 °C.
- Ecógrafo Toshiba NemioMX SSA-590[®].
- Báscula Toledo ICS4 MT[®], con precisión de $\pm 0,1$ gr.

5.3. ANIMALES

Los animales empleados en este estudio pertenecen a la generación 12 del experimento de selección divergente por varianza ambiental del carácter tamaño de camada al parto llevado a cabo en las instalaciones de la EPSO. La varianza ambiental del tamaño de la camada se calcula como la varianza del tamaño de la camada dentro de hembra después de que el tamaño de la camada se corrija previamente por el año-estación y el estado de parto-lactación (primer parto, segundo parto y superiores en hembras lactantes a la monta, y segundo parto y superiores en hembras no lactantes a la monta), para evitar efectos sistemáticos que pudieran afectar a la varianza. La varianza fenotípica dentro de hembra representa la varianza ambiental para el tamaño de camada bajo el supuesto de que la determinación genética es aproximadamente la misma para todos los partos de una coneja y los efectos permanentes son los mismos en todos los partos (Piles *et al.*, 2006). La varianza para cada hembra (V_e) se calculó utilizando el estimador de riesgo cuadrático mínimo:

$$Ve = \frac{1}{n + 1} \sum_{1}^n (xi - \bar{x})^2$$

donde xi es el tamaño de camada precorregido del parto i de una coneja, y n es el número total de partos de la coneja (n varía de 2 a 9) y \bar{x} la media del tamaño de camada (Blasco, 2017).

La línea seleccionada para disminuir la varianza del tamaño de camada al parto se denomina línea homogénea y la línea seleccionada para incrementar la varianza ambiental del tamaño de camada se denomina línea heterogénea. Cada una de las líneas está formada aproximadamente por 125 hembras y 25 machos en cada generación. Todas las hembras se clasificaron en función de su estimación de la varianza del tamaño de la camada, sin utilizar la información del pedigrí para la evaluación genética. La presión de selección vía hembra es del 20%. Cada macho se apareó con cinco hembras y se seleccionó un hijo de cada macho de la mejor hembra. Esta selección familiar dentro del mismo macho se realizó para reducir la consanguinidad.

Los animales han tenido acceso libre al suministro de agua, y la alimentación ha sido *ad libitum* con un pienso comercial (Nutricun Elite Gra[®] de Heus Nutrición Animal, La Coruña, España) (17% proteína bruta, 16% fibra, 3,5% grasa). Las conejas y sus gazapos lactantes se han alojado en jaulas individuales polivalentes de dimensiones (37,5 x 33 x 90 cm) bajo un fotoperíodo constante de 16 h luz continua por 8 h oscuridad continua, y con ventilación controlada.

Las hembras se llevaron a cubrición mediante monta natural por primera vez a las 18 semanas de vida y, posteriormente a los 10 días post-parto. El manejo reproductivo es en bandas semanales. Las hembras con gazapos tuvieron acceso libre a los nidales desde 2 días antes del parto hasta 21 días después del parto, cuando se retiraron los nidos. Los gazapos se destetaron a los 28 días de edad sin haber realizado adopciones para homogeneizar las camadas.

5.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

En esta tesis doctoral se han desarrollado 3 estudios solapándose en el tiempo varios procesos de la parte experimental de los mismos.

Estudio 1: Estudio preliminar de emisividad de temperatura corporal en conejas seleccionadas por variabilidad residual del tamaño de camada (*Preliminary study of body temperature emissivity in rabbits selected for litter size residual variability*).

Se planteó el estudio de la termografía infrarroja medida en ojos como método inocuo de determinar el nivel de estrés de las conejas en su segunda monta efectiva y se estudiaron

los cambios de emisividad de temperatura ante un estímulo estresante en líneas divergentes.

Estudio 2: Respuesta correlacionada a la selección por variabilidad residual del tamaño de camada al parto en la condición corporal de las conejas (*Correlated response to selection for litter size residual variability in rabbit's body condition*).

Se estudió la eficiencia de las conejas en su segundo parto, de la movilización de reservas corporales, centrándose en el peso vivo de los animales y en el espesor de la grasa perirrenal medido mediante ecografías.

Estudio 3: Diferencias en la supervivencia de camadas entre líneas seleccionadas divergentemente por sensibilidad ambiental en conejos. (*Litter survival differences between divergently selected lines for environmental sensitivity in rabbits*).

Se evaluó la supervivencia de las camadas de las conejas de las líneas divergentes hasta el destete, el peso individual de los gazapos y el peso de las camadas.

En el conjunto de los tres estudios se han medido y registrado las siguientes variables:

- Emisividad de temperatura corporal. Se tomaron termografías de los ojos a la segunda monta, a los 5 minutos, 30 minutos y 60 minutos de la monta.
- Movilización de reservas corporales. Se midió el peso individual de las conejas a las 4 y 9 semanas de vida, a la segunda monta, al parto, a los 10 días postparto y al destete. También se midió el espesor de grasa perirrenal de las conejas a la segunda monta, al parto, a los 10 días postparto y al destete.
- Crecimiento de los gazapos. Se registró el peso individual de los gazapos al parto, peso individual de los gazapos vivos al parto, peso de cada camada al parto, peso de cada camada viva al parto, peso individual de los gazapos y de cada camada al destete.

La emisividad de calor corporal se midió con la cámara termográfica FLIR SC660[®] a 70cm de distancia de los animales y se procesaron los registros con el programa ThermaCAM Researcher Pro 2.10[®].

El espesor de la grasa perirrenal se midió utilizando el ecógrafo Toshiba NemioMX SSA-590[®] y siguiendo la técnica descrita por Pascual *et al.*, 2004.

Todas las mediciones de peso se realizaron con la báscula Toledo ICS4 MT[®].

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos fueron registrados en bases de datos creadas en Excel (Microsoft, Redmond, WA, EE. UU.) y de Google Sheets (Google LLC). Estos datos se analizaron estadísticamente con diferentes programas según el caso:

Mediante metodología bayesiana se analizaron las diferencias entre las líneas para la emisividad de temperatura corporal antes y después del estímulo estresante, además de la condición corporal, las distancias entre los pesos individuales de los gazapos vivos y muertos, los pesos de las camadas y de los pesos individuales de los gazapos, para ello se utilizó el programa estadístico Rabbit desarrollado por el Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universitat Politècnica de València.

Para analizar las relaciones entre la condición corporal de la coneja reproductora sobre la receptividad y fertilidad se usó el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2019, Cary, CA, USA). Se utilizó este mismo software para analizar la relación entre la supervivencia y el peso individual del gazapo.

6. PUBLICACIONES

6.1. PUBLICACIÓN 1

***Preliminary study of body temperature emissivity in rabbits
selected for litter size residual variability***


Iván Agea
María de la Luz García
María José Argente

Agriculture

<https://doi.org/10.3390/agriculture11070604>

Article

Preliminary Study of Body Temperature Emissivity in Rabbits Selected for Litter Size Residual Variability

Iván Agea * , María de la Luz García  and María-José Argente 

Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Miguel Hernández University, Ctra. de Beniel km 3.2, 03312 Orihuela, Spain; mariluz.garcia@umh.es (M.d.l.L.G.); mj.argente@umh.es (M.-J.A.)

* Correspondence: iagea@umh.es; Tel.: +34-663-958-933

Abstract: A divergent selection for litter size residual variability has been carried out in rabbits during 12 generations. Litter size residual variability was estimated as phenotypic variance of litter size within females after correcting for the year-season and the parity-lactation status effects. Stress causes an increase in core body temperature. Infrared thermography (IRT) has been shown to be a useful technique for identifying changes in body temperature emissivity. The aim of this work is to study the correlated response to selection for litter size residual variability in body temperature emissivity at natural mating. Natural mating can be considered a stressful stimulus for does. Temperature was measured in the eyeball by IRT before mating (basal temperature) and after 5 min, 30 min, and 60 min in does of the lines selected to decrease and to increase litter size residual variability (i.e., the Low and the High lines). Both lines showed similar basal temperature. Eyeball temperature was increased slightly in the Low line from basal state to 5 min after stressful stimulus (from 35.69 °C to 36.32 °C), and this increase remained up to 60 min after stress (36.55 °C). The High line showed a higher temperature than the Low line at 30 min (+0.96 °C, $p = 0.99$). At 60 min, temperature was similar between lines. The evolution of temperature was different between lines: the High line reached the peak of temperature later than the Low line (at 30 min vs. 5 min), and its peak was higher compared to the Low line (36.95 °C vs. 36.32 °C). In conclusion, the does selected for reducing litter size variability showed a lower increase in temperature after a stressful stimulus, therefore showing lower stress and consequently better welfare.

Keywords: fertility; lactation; rabbit; selection; stress; temperature; thermography



check for updates

Citation: Agea, I.; García, M.d.l.L.; Argente, M.-J. Preliminary Study of Body Temperature Emissivity in Rabbits Selected for Litter Size Residual Variability. *Agriculture* **2021**, *11*, 604. <https://doi.org/10.3390/agriculture11070604>

Academic Editor:
Agnieszka Ludwiczak

Received: 31 May 2021
Accepted: 25 June 2021
Published: 28 June 2021

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



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

1. Introduction

Livestock industry and consumer are increasingly concerned on farm animal welfare. Animal welfare is directly related to animal's stress and healthy. Stress has commonly been measured not only by cortisol levels in blood but also as cortisol metabolites in feces, hair, and urine [1]. Neutrophil-lymphocyte ratio has been employed as a stress measurement as well [2], because the duration of stress affects leucocyte populations [3]. However, a major issue for animal welfare is that these techniques involve invasive procedures which may themselves cause a stress response and therefore affect the measurement of interest [4].

Infrared thermography (IRT) is an accepted technique for measuring body heat losses [5]. This technique has been used to find differences in body temperature emissivity in eyes, ears and nose in rabbits stressed due to environmental challenges [6]. IRT technique has the advantage of being fast, non-invasive and requiring minimal handling of the animals [4]. A higher body temperature in rabbits has been related to a higher level of cortisol metabolites in feces and therefore to higher stress [6,7]. The monitoring of the body surface temperature variations in animals can be used to assess the onset of estrus, the inflammatory processes, the adaptability to heat, and the tolerance to stress [8].

A divergent selection experiment for litter size residual variance has been performed successfully in rabbits. The High line and the Low lines diverged around 5% from the

original mean per generation [9]. Litter size residual variance has directly related to environmental sensitivity, i.e., with coping of animals to environmental challenges [10]. In this regard, the Low line presented a better behavior against stress and diseases, and in consequence culling rate was lower in the Low line than in the High line [11]. Moreover, the Low line showed better body condition and lower fat mobilization at situations of high-energy demand [12]. Therefore, selection for reducing litter size residual variance could be a useful tool to improve welfare in dams. The aim of this work is to study the correlated response to selection for litter size residual variability in the development of body temperature emissivity.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

All experimental procedures were approved by the Miguel Hernández University of Elche Research Ethics Committee, according to Council Directives 98/58/EC and 2010/63/EU (reference number 2017/VSC/PEA/00212).

2.2. Experimental Animals

A divergent selection experiment was carried out for litter size variability over twelve generations (High and Low line). The selection was based on the phenotypic variation of the litter size within the female, after correcting the litter size for both the year-season and the parity-lactation status. All the animals were bred in individual cages (37.5 cm × 33 cm × 90 cm) indoor at the farm of the Miguel Hernández University (Spain). The does were mated the first time at 18 weeks of age and later at 10 days after delivery. The non-receptive does were mated again the following week. Fertile natural matings were considered those that ended in parturition. The pregnancy diagnosis was made by abdominal palpation 12 days after natural mating, and the kits were weaned at 28 days of age.

An experiment was performed to analyze the progress in body temperature of does in the first hour after natural mating. Each doe was moved to a male cage for natural mating. After copulation, the doe was returned to her cage. Handling, grouping, and mating are considered stressful stimuli [13–15]. The body temperature emissivity was measured by IRT of the eyeball. All IRTs were performed on the does' cages.

A total of 21 does of the Low line and 22 does of the High line were used to measure the eyeball temperature emissivity before the second natural mating, and at 5, 30, and 60 min later. The temperature recorded before the second natural mating was considered the basal temperature. The experiment was carried out in two sessions with an environmental temperature of 20 °C and 24 °C.

Another experiment was performed to study the effect of environment, lactation status and fertility in basal temperature and in range between the basal temperature and 60 min after natural mating with the same procedures of the first experiment. The temperature emitted by the eyeball was measured in 56 does of the Low line and 37 does of the High line. The experiment was carried out in 11 sessions that were grouped according to the environmental temperature (Table 1).

Table 1. Distribution of thermographic sessions according to environmental temperature.

	Environment 1	Environment 2
Number of sessions	4	7
Number of does	46	47
Mean temperature (°C)	12.5	18.1
Standard deviation (°C)	0.95	1.51

All temperature emissivity images were taken at 0.7 m of the doe with a [®]FLIR SC660 thermal imaging camera and processed with [®]ThermaCAM Researcher Pro 2.10 software

to obtain the temperature record (Figure 1). Two thermographs of each rabbit were taken at each moment, and the maximum temperature recorded in each pair was averaged.



Figure 1. Thermographic image of a rabbit photographed with the [®]FLIR SC660 thermal imaging camera.

2.3. Traits

The following traits were analyzed: temperature just before the second mating (basal temperature), temperature 5, 30, and 60 min after mating, temperature range, and individual weight at mating. Temperature range was defined as the difference between basal temperature and 60 min after mating.

2.4. Statistical Analysis

The model for analyzing the progress in temperature in the first hour after stressful stimulus included the effects of environmental temperature (two levels: session 1 with environmental temperature of 20 °C and session 2 with environmental temperature of 24 °C) and line-moment (eight levels; low line before mating, low line at 5 min, low line at 30 min, low line at 60 min, high line before mating, high line at 5 min, high line at 30 min, and high line at 60 min), the random effect of female, and female weight as covariate.

The model for analyzing the effect of environment, lactating status, and fertility included the effects of environmental temperature (two levels, see Table 1), lactation status (two levels: lactating and non-lactating does), fertile mating (two levels; fertile and non-fertile), line (two levels; the Low line and the High line), and female weight as covariate.

All analyses were performed using Bayesian methodology [9]. Bounded uniform priors were used for all effects with the exception of the female effect, which was considered normally distributed with mean 0 and variance $I\sigma_f^2$, where I is a unity matrix and σ_f^2 is the variance of the female effect. Female and residual effects were considered to be independent. Residuals were a priori normally distributed with mean 0 and variance $I\sigma_e^2$. The priors for the variances were also bounded uniform. Features of the marginal posterior distributions for all unknowns were estimated using Gibbs sampling. The Rabbit program developed by the Institute for Animal Science and Technology (Valencia, Spain) was used for all procedures. A chain of 60,000 samples was used, with a burn-in period of 10,000. Only one out of every 10 samples was saved for inferences. Convergence was

tested using the Z criterion of Geweke and Monte Carlo sampling errors were computed using time-series procedures.

3. Results

3.1. Correlated Response to Selection in Temperature Emissivity

Figure 2 shows that the Low and the High lines displayed similar eyeball temperature at baseline moment. The Low line increased slightly eyeball temperature at 5 min after stressful stimulus (from 35.69 °C to 36.32 °C), and this increase remained up to 60 min after stress (36.55 °C). The High line showed higher temperature than the Low line at 30 min (+0.96 °C, $p = 0.99$). At 60 min, temperature was similar between lines. The evolution of temperature was different between lines, since the High line reached the peak of temperature later than the Low line (at 30 min vs. 5 min), and its peak was higher compared to the Low line (36.95 °C vs. 36.32 °C).

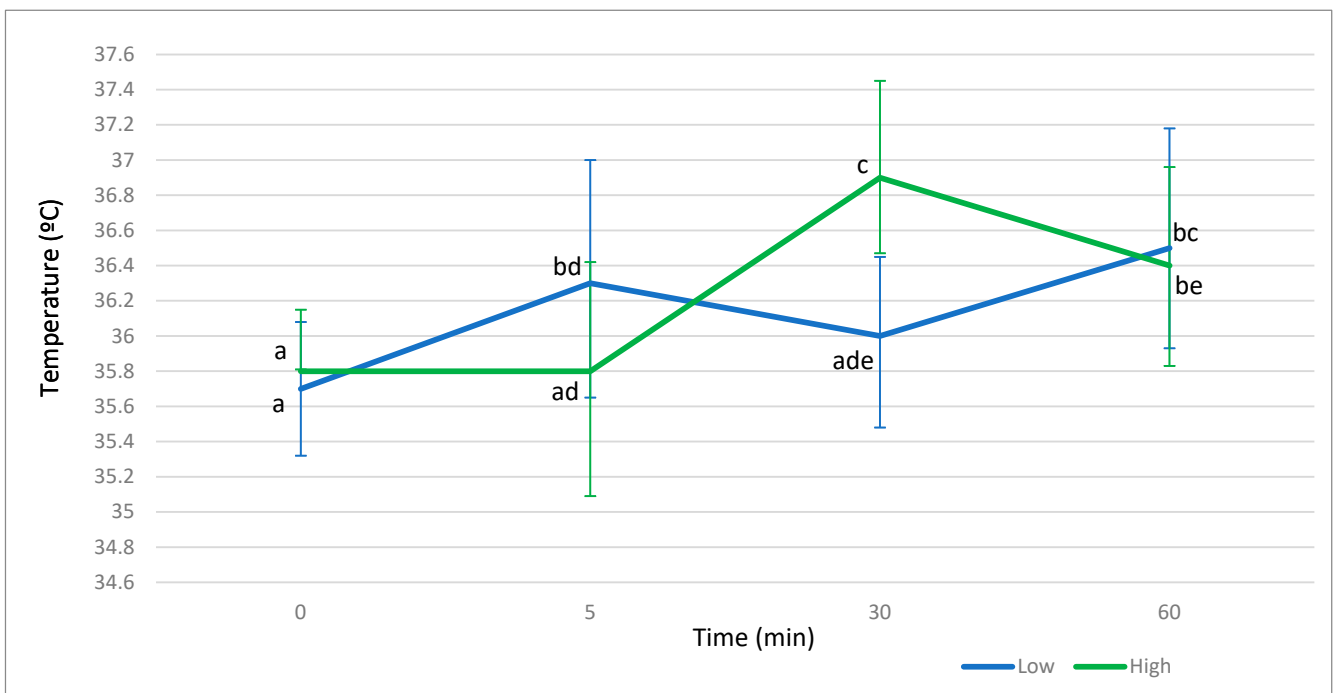


Figure 2. Evolution of eyeball temperature to basal time, 5 min, 30 min, and 60 min after stressful stimulus in the Low and the High line. Different letters mean differences with p greater than 0.90. Bars indicate highest posterior density region at 95%.

3.2. Effect of Season and Lactating Status of Does in Eyeball Temperature

Table 2 shows the features of marginal posterior distributions of the difference between Environment 1 and Environment 2 for basal eyeball temperature and temperature range. Does showed lower basal temperature emissivity in Environment 1 (-1.09 °C, $p = 1$) than in Environment 2. No evidence of difference in temperature variation was found between environments ($p = 0.79$).

Table 2. Effect of Environments on basal temperature and temperature range between basal and 60 min.

Time ($n = 93$)	Environment 1	Environment 2	$D_{Env1-Env2}$	HPD _{95%}	p
Basal	32.19	33.28	-1.09	-1.78, -0.39	1
Basal-60 min	2.01	2.32	-0.31	-1.07, 0.44	0.79

n : number of data. $D_{Env1-Env2}$: differences in eyeball temperature between Environments [1 and 2]. HPD_{95%}: highest posterior density region at 95%. p : probability of the difference being >0 when $D_{Env1-Env2} > 0$ or being <0 when $D_{Env1-Env2} < 0$.

Table 3 shows the features of marginal posterior distributions of the difference between lactating and non-lactating does for basal eyeball temperature and between basal eyeball temperature and 60 min after the stressful stimulus of mating. Non-lactating does had higher basal temperature than lactating ones (+0.60 °C, $p = 0.97$). It should be noted that non-lactating does showed lower temperature variation between basal eyeball temperature and 60 min after stressful stimulus than lactating does (−0.55 °C, $p = 0.92$).

Table 3. Effect of lactation on basal temperature and temperature range between basal and 60 min.

Time ($n = 93$)	Non-Lactating (°C)	Lactating (°C)	D_{nl-l}	HPD _{95%}	p
Basal	33.21	32.61	0.60	−0.01, 1.27	0.97
Basal-60 min	1.82	2.37	−0.55	−1.30, 0.25	0.92

n : number of data. D_{nl-l} : differences in eyeball temperature between non-lactating and lactating does. HPD_{95%}: highest posterior density region at 95%. p : probability of the difference being >0 when $D_{nl-l} > 0$ or being <0 when $D_{nl-l} < 0$.

Not enough evidence of differences between fertile and non-fertile natural matings in basal eyeball temperature or temperature variation was found (Table 4).

Table 4. Effect of fertility on basal temperature and temperature range between basal and 60 min.

Temperature ($n = 93$)	Fertile (°C)	Non-Fertile (°C)	D_{f-nf}	HPD _{95%}	p
Basal	33.99	32.85	0.12	−0.49, 0.78	0.64
Basal-60 min	1.91	2.28	−0.37	−1.12, 0.39	0.83

n : number of data. D_{f-nf} : differences in eyeball temperature between fertile and non-fertile does. HPD_{95%}: highest posterior density region at 95%. p : probability of the difference being >0 when $D_{f-nf} > 0$ or being <0 when $D_{f-nf} < 0$.

4. Discussion

4.1. Correlated Response to Selection in Temperature Emissivity

Different approaches have been developed to improve the ability of animals to cope with environmental perturbations without decreasing their production. Litter size uniformity is directly related to environmental sensitivity. Therefore, selection for litter size residual variance has been shown to be a suitable methodology for obtaining more resilient animals. Beloumi [10] and Argente [11] found that the Low line had a major immunity, a better behavior of inflammatory markers, and a superior reaction against infections, which would be related to a better response of this line to stressful conditions. In a previous study, García [12] found that the Low line made more efficient use of energy reserves than the High line in stages of high demand such as delivery and lactation. This would suggest a better response to stress from the Low line with respect to the High line. In this study, the lines showed a different pattern in the evolution of eyeball temperature after a stressful stimulus. The temperature increased by 3.2% in the High line, while the increment was almost half in the low line (1.8%). A higher temperature emissivity is related to a greater effect of stress [6,7]. Thus, our study would provide new evidence of the lower stress sensitivity of the Low line.

As far as we know, this is the first time that the evolution of eyeball temperature after a stressful stimulus has been studied in rabbits. Both lines had a higher eye temperature 60 min after mating than at basal time. Maintaining a high temperature after a stressful stimulus depends on the species. Thus, in sport horses, it has been shown that the temperature emissivity measured in the eye is higher from 5 min after a competition and even at 3 h than in its basal state [16,17]. In rats, it has been seen that the eye temperature returned to basal level 14 min after the stressful stimulus [18].

4.2. Effect of Season and Lactating Status of Does in Eyeball Temperature

The environment temperature is very important for rabbit health because rabbits cannot effectively sweat, and panting is not efficient for cooling [19]. Higher basal eye

temperature emissivity in Environment 2 (average temperature of 18.1 °C) than Environment 1 (average temperature of 12.1 °C) was found. Does reacted with higher emissivity of body temperature to keep their homeostasis against the environment with high temperature [6,7,20].

Lactation is considered a stressful period to does. Our results showed that basal eyeball temperature and the increment in temperature from mating to 60 min later were greater in lactating does than in non-lactating ones. This agrees with higher cortisol levels in lactating does than non-lactating does reported by Argente et al. [21].

Similar basal temperature and temperature range was found in fertile and non-fertile mating. Ovulation in rabbit does is induced by coitum, and ova are released between 10 and 12 h after mating [22]. Therefore, our findings show that basal temperature and temperature variations at 10–12 h before ovulation would have no effect in the fertilization of ova.

5. Conclusions

Selection for litter size residual variance showed a correlated response in does' body temperature. The does selected for reducing litter size variability showed a lower increase in temperature after a stressful stimulus, which would suggest a better welfare of these females. This study should be considered preliminary and it will be necessary to conduct additional studies to confirm these results.

Author Contributions: Conceptualization, I.A.; methodology, I.A.; formal analysis, I.A., M.d.I.L.G., and M.-J.A.; data curation, I.A.; writing—original draft preparation, I.A.; writing—review and editing, I.A.; supervision, M.d.I.L.G. and M.-J.A.; and, funding acquisition, M.-J.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Ministerio de Ciencia e Innovación (MCI)-Agencia Estatal de Investigación (AEI) and el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), grant number AGL2017-86083-C2-2-P.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of Council Directives 98/58/EC and 2010/63/EU, and approved by the Miguel Hernández University of Elche Research Ethics Committee (protocol code 2017/VSC/PEA/00212).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available upon request to the corresponding author.

Acknowledgments: We acknowledge technical support by J.R. Díaz from Miguel Hernández University of Elche. We acknowledge A. Blasco for his comments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Möstl, E.; Palme, R. Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2002**, *23*, 67–74. [[CrossRef](#)]
2. Widowski, T.M.; Curtis, S.E.; Graves, C.N. THE NEUTROPHIL:LYMPHOCYTE RATIO IN PIGS FED CORTISOL. *Can. J. Anim. Sci.* **1989**, *69*, 501–504. [[CrossRef](#)]
3. Urbanová, M.; Kramářová, E.; Chloupek, J.; Najmanová, M. Evaluation of stress in laboratory rabbits used for teaching purposes. *Acta Vet. Brno* **2019**, *88*, 249–255. [[CrossRef](#)]
4. Stewart, M.; Webster, J.R.; Schaefer, A.L.; Cook, N.J.; Scott, S.L. Infrared thermography as a non-invasive tool to study animal welfare. *Anim. Welf.* **2005**, *14*, 319–325.
5. Ricci, G.D.; Da Silva-Miranda, K.O.; Titto, C.G. Infrared thermography as a non-invasive method for the evaluation of heat stress in pigs kept in pens free of cages in the maternity. *Comput. Electron. Agric.* **2019**, *157*, 403–409. [[CrossRef](#)]
6. de Lima, V.; Piles, M.; Rafel, O.; López-Béjar, M.; Ramón, J.; Velarde, A.; Dalmau, A. Use of infrared thermography to assess the influence of high environmental temperature on rabbits. *Res. Vet. Sci.* **2013**, *95*, 802–810. [[CrossRef](#)]
7. Marai, I.; Ayyat, M.; El-Monem, U.A. Growth Performance and Reproductive Traits at First Parity of New Zealand White Female Rabbits as Affected by Heat Stress and Its Alleviation under Egyptian Conditions. *Trop. Anim. Health Prod.* **2001**, *33*, 451–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. McManus, C.; Tanure, C.B.; Peripolli, V.; Seixas, L.; Fischer, V.; Gabbi, A.M.; Menegassi, S.R.O.; Stumpf, M.T.; Kolling, G.J.; Dias, E.; et al. Infrared thermography in animal production: An overview. *Comput. Electron. Agric.* **2016**, *123*, 10–16. [[CrossRef](#)]

9. Blasco, A. *Bayesian Data Analysis for Animal Scientists*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2018.
10. Beloumi, D.; Blasco, A.; Muelas, R.; Santacreu, M.A.; García, M.D.L.L.; Argente, M.-J. Inflammatory Correlated Response in Two Lines of Rabbit Selected Divergently for Litter Size Environmental Variability. *Animals* **2020**, *10*, 1540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Argente, M.J.; García, M.L.; Zbyňovská, K.; Petruška, P.; Capcarova, M.; Blasco, A. Correlated response to selection for litter size environmental variability in rabbits' resilience. *Animal* **2019**, *13*, 2348–2355. [[CrossRef](#)]
12. García, M.L.; Blasco, A.; Argente, M.J. Correlated response in body condition and energy mobilisation in rabbits selected for litter size variability. *Animal* **2019**, *13*, 784–789. [[CrossRef](#)]
13. Rushen, J.; A Taylor, A.; de Passillé, A.M. Domestic animals' fear of humans and its effect on their welfare. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **1999**, *65*, 285–303. [[CrossRef](#)]
14. Gerencsér, Z.; Matics, Z.; Szabó, R.T.; Kustos, K.; Mikó, A.; Nagy, I.; Odermatt, M.; Atkári, T.; Szendrő, Z. Aggressiveness, Mating Behaviour and Lifespan of Group Housed Rabbit Does. *Animals* **2019**, *9*, 708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bakker, J.; Baum, M.J. Neuroendocrine Regulation of GnRH Release in Induced Ovulators. *Front. Neuroendocr.* **2000**, *21*, 220–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Valera, M.; Bartolomé, E.; Sánchez, M.J.; Molina, A.; Cook, N.; Schaefer, A. Changes in Eye Temperature and Stress Assessment in Horses During Show Jumping Competitions. *J. Equine Vet. Sci.* **2012**, *32*, 827–830. [[CrossRef](#)]
17. Bartolomé, E.; Sánchez, M.J.; Molina, A.; Schaefer, A.L.; Cervantes, I.; Valera, M. Using eye temperature and heart rate for stress assessment in young horses competing in jumping competitions and its possible influence on sport performance. *Animal* **2013**, *7*, 2044–2053. [[CrossRef](#)]
18. Vianna, D.M.L.; Carrive, P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **2005**, *21*, 2505–2512. [[CrossRef](#)]
19. Marai, I.; Habeeb, A.; Gad, A. Rabbits' productive, reproductive and physiological performance traits as affected by heat stress: A review. *Livest. Prod. Sci.* **2002**, *78*, 71–90. [[CrossRef](#)]
20. Jaén-Téllez, J.A.; Sánchez-Guerrero, M.J.; López-Campos, J.I.; Valera, M.; González-Redondo, P. Acute stress assessment using infrared thermography in fattening rabbits reacting to handling under winter and summer conditions. *Span. J. Agric. Res.* **2020**, *18*, e0502. [[CrossRef](#)]
21. Argente, M.-J.; García, M.D.L.L.; Birlanga, V.; Muelas, R. Relationship between cortisol and acute phase protein concentrations in female rabbits. *Vet. J.* **2014**, *202*, 172–175. [[CrossRef](#)]
22. Bosco, A.D.; Rebollar, P.; Boiti, C.; Zerani, M.; Castellini, C. Ovulation induction in rabbit does: Current knowledge and perspectives. *Anim. Reprod. Sci.* **2011**, *129*, 106–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6.2. PUBLICACIÓN 2

***Correlated response to selection for litter size residual variability
in rabbits' body condition***

Iván Agea
María de la Luz García
Agustín Blasco
Peter Massányi
Marcela Capcarová
María José Argente

Animals

<https://doi.org/10.3390/ani10122447>

Article

Correlated Response to Selection for Litter Size Residual Variability in Rabbits' Body Condition

Iván Agea ¹, María de la Luz García ¹, Agustín Blasco ², Peter Massányi ³,
Marcela Capcarová ³ and María-José Argente ^{1,*}

¹ Departamento de Tecnología Agroalimentaria, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández de Elche, Ctra. de Beniel km 3.2, 03312 Orihuela, Spain; iagea@umh.es (I.A.); mariluz.garcia@umh.es (M.d.l.L.G.)

² Institute for Animal Science and Technology, Universitat Politècnica de València, P.O. Box 22012, 46022 València, Spain; ablasco@dca.upv.es

³ Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, 949 76 Nitra, Slovakia; massanyip@gmail.com (P.M.); marcela.capcarova@uniag.sk (M.C.)

* Correspondence: mj.argente@umh.es; Tel.: +34-966-749-708

Received: 11 November 2020; Accepted: 17 December 2020; Published: 21 December 2020



Simple Summary: Selection for decreasing litter size residual variance has been proposed as an indirect way to select for resilience. Resilience has been directly related to welfare. A good body condition and efficient body fat mobilization have been associated with an optimal level of animal welfare. Two rabbit lines have been divergently selected for litter size residual variability. The low line selected for decreasing litter size variance more efficiently managed the body fat from mating to weaning in the second productive cycle in females compared to the high line, which could be related to the lower culling rate reported previously in the low line. Therefore, body condition can be used as a useful biomarker of resilience.

Abstract: A divergent selection experiment for residual variance of litter size at birth was carried out in rabbits during twelve generations. Residual variance of litter size was estimated as the within-doe variance of litter size after pre-correction for year and season as well as parity and lactation status effects. The aim of this work was to study the correlated response to selection for litter size residual variability in body condition from mating to weaning. Body condition is related directly to an animal's fat deposits. Perirenal fat is the main fat deposit in rabbits. Individual body weight (IBW) and perirenal fat thickness (PFT) were used to measure body condition at second mating, delivery, 10 days after delivery, and weaning. Litter size of the first three parities was analyzed. Both lines decreased body condition between mating to delivery; however, the decrease in body condition at delivery was lower in the low line, despite this line having higher litter size at birth (+0.54 kits, $p = 0.93$). The increment of body condition between delivery and early lactation was slightly higher in the low line. On the other hand, body condition affected success of females' receptivity and fertility at the third mating, e.g., receptive females showed a higher IBW and PFT than unreceptive ones (+129 g and +0.28 mm, respectively), and fertile females had a higher IBW and PFT than unfertile ones (+82 g and +0.28 mm, respectively). In conclusion, the does selected for reducing litter size variability showed a better deal with situations of high-energy demand, such as delivery and lactation, than those selected for increasing litter size variability, which would agree with the better health and welfare condition in the low line.

Keywords: body condition; fertility; litter size variability; rabbits; selection

1. Introduction

Animal welfare is a priority in livestock production for ethical reasons and also because poor animal welfare is associated with low production, poor health, and larger culling rate [1]. Resilience is defined as the ability of an animal to maintain or quickly recover its performance in spite of environmental perturbations [2,3], thus it is directly related to welfare. The ability of an animal to efficiently mobilize its fat reserves can be essential for it to maintain, or quickly return to its production level. Body condition has been traditionally employed to measure the mobilization of fat reserves in livestock animals (Schröder and Staufenbiel [4] in cattle; Maes et al. [5] in pigs; Pascual et al. [6] in rabbits). Body condition has been commonly used as a welfare indicator, due to its relations with fertility success and prevention of diseases (Barletta et al. [7] in cattle; van Staaveren et al. [8] in pigs; Sánchez et al. [9] in rabbits). Therefore, body condition may be connected to resilience, and monitoring it may be useful in resilience assessments.

Recently, residual variance has been proposed as a measure of resilience [10,11]. A direct divergent selection experiment for residual variance in litter size has been performed successfully in rabbits at the Universidad Miguel Hernández de Elche [12]. The high and low lines showed a remarkable difference in residual variance of litter size (4.5% of the mean of the base population). There were also differences in sensitivity to stress and diseases, which lowered the culling rate in the low line [11]. In this regard, the more homogeneous line coped better with environmental stressors such as infections and acute stress than the heterogeneous line which showed higher resilience [11,13].

In an early experiment with the first generations of selection, García et al. [14] found that the low line had a favorable correlated response to selection in body condition and fat reserve mobilization at birth. The objective of this work was to study the correlated response to selection for litter size residual variability in the development of body condition from mating to weaning.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

All experimental procedures were approved by the Miguel Hernández University of Elche Research Ethics Committee, according to Council Directives 98/58/EC and 2010/63/EU (reference number 2017/VSC/PEA/00212).

2.2. Experimental Animals

Animals came from the twelfth generation of a divergent selection experiment for residual variance of litter size (see more details in Blasco et al. [12]). A total of 121 females of the low line (homogeneous) and 124 females of the high line (heterogeneous) were used to estimate the response to selection and correlated responses in litter size at first, second and third parity, and correlated responses in individual body weight at 4 weeks and 9 weeks old. A subset of 100 primiparous females from the low line and 74 primiparous females from the high line were used to measure the development of body condition in the second reproductive cycle and to study the body condition effect on doe's receptivity and fertility.

All animals were kept on a farm at the Miguel Hernández University of Elche (Spain). Rabbits were fed a standard commercial diet (17% crude protein, 16% fiber, 3.5% fat, Nutricun Elite Gra[®], De Heus Nutrición Animal, La Coruña). Food and water were provided ad libitum. Females were housed in individual cages (37.5 cm × 33 cm × 90 cm) under a constant photoperiod of 16 h continuous light (8 h continuous darkness and controlled ventilation throughout the experiment). The experiment took place from December to August. They were first mated at 18 weeks of age and at 10 days after parturition thereafter. Gestation was checked by abdominal palpation 12 d after mating. Litters were not standardized and weaning was at 28 d after delivery.

2.3. Traits

Individual body weight at 4 weeks and 9 weeks old and litter size at birth were recorded. Residual variance of litter size was estimated for all females of the twelfth generation considering all

parties, after pre-correcting litter size for the effects of year and season and parity and lactation status. Individual body weight and perirenal fat thickness were recorded at four different physiological stages: second mating, delivery, 10 days after delivery and weaning. Perirenal fat thickness was measured by ultrasound imaging to evaluate body fat reserves as described by Pascual et al. [15] using Toshiba NemioMX SSA-590 ultrasound equipment (Toshiba, Tokyo, Japan). Receptivity and fertility were recorded at third mating (i.e., 10 days after second delivery). Receptivity (acceptance or rejection of the male at mating) was defined as a binary trait as was fertility (pregnant or non-pregnant females at palpation).

2.4. Statistical Analysis

2.4.1. Correlated Response to Selection for Residual Variance

Models included a different set of effects depending on the trait. The following models were used: residual variance of litter size at birth had only the effect of line (two levels, high and low line); individual body weight at 4 weeks and 9 weeks old, litter size at first parity had the effects of line and season; litter size at second and third parity had the effects of line, season and lactation status (two levels: lactating and non-lactating female at mating); individual body weight and perirenal fat thickness had the effects of line-time (eight levels: low line at mating, high line at mating, low line at delivery, high line at delivery, low line 10 days after delivery, high line 10 days after delivery, low line at weaning, and high line at weaning), season, lactation status (two levels: lactating and non-lactating female when recording data) and the dam permanent effect.

All analyses were performed using Bayesian methodology [16]. Bounded uniform priors were used for all effects with the exception of the dam permanent effect, considered normally distributed with mean 0 and variance σ_p^2 . Residuals were a priori normally distributed with mean 0 and variance σ_e^2 and uncorrelated with the dam effects. The priors for the variances were also bounded uniform. Features of the marginal posterior distributions for all unknowns were estimated using Gibbs sampling. The Rabbit program developed by the Institute for Animal Science and Technology (Valencia, Spain) was used for all procedures. We used a chain of 60,000 samples, with a burn-in period of 10,000. Only one out of every 10 samples were saved for inferences. Convergence was tested using the Z criterion of Geweke and Monte Carlo sampling errors were computed using time-series procedures.

2.4.2. Effect of Body Condition on Receptivity and Fertility

We analyzed the difference on body condition at third mating (i.e., at 10 days after second delivery) between receptive and non-receptive does, using a model with the effects of line, season, lactation status, and receptivity with two levels (acceptance or rejection of the male at first attempt). In order to study the difference on body condition at mating between fertile and infertile does, we used a model with the effects of line, season, lactation status and fertility with two levels (pregnant or non-pregnant female at palpation).

A probit regression was performed to assess the effect of individual body weight and perirenal fat thickness at third mating on probability of successful receptivity and fertility using the former models. The probit procedure of the statistical package SAS was used for this analysis (SAS Institute, 2019, Cary, CA, USA).

3. Results

3.1. Correlated Response to Selection for Residual Variance

Table 1 shows the features of marginal posterior distributions of the differences between lines for litter size residual variance, litter size at first, second and third parity, and individual body weight at 4 weeks and 9 weeks old. The probability of these differences being greater than zero if $D_{L-H} > 0$ or lower than zero if $D_{L-H} < 0$ is shown. In a Bayesian context there are no significance levels; instead, we offer the actual probability of the differences. As the environmental effects are the same for both

lines, the differences between lines (D_{L-H}) are genetic differences, so they estimate the response and correlated responses to selection. The low line showed a lower litter size variability than the high line (-1.45 kits^2 , $p = 1.00$), and a higher litter size in the first parities ($+0.42 \text{ kits}$, $p = 0.90$ in first parity; $+0.54 \text{ kits}$, $p = 0.93$ in second parity; $+0.66 \text{ kits}$, $p = 0.94$ in third parity). The low line had similar body weight to the high line at 4 weeks and 9 weeks old.

Table 1. Features of the marginal posterior distribution of the differences for litter size residual variance at birth (Ve), litter size at first (LS1), second (LS2) and third (LS3) parity, and individual body weight at 4 weeks (IB4w) and at 9 weeks old (IB9w) in rabbits.

	L (n = 121)	H (n = 124)	D_{L-H}	HPD _{95%}	p
Ve, kits ²	2.78	4.23	-1.45	-2.22, -0.67	1.00
LS1, kits	7.54	7.12	0.42	0.26, 1.04	0.90
LS2, kits	8.31	7.77	0.54	-0.19, 1.29	0.93
LS3, kits	8.93	8.27	0.66	-0.19, 1.48	0.94
IB4w, g	732	754	-22	-93.2, 43.9	0.74
IB9w, g	1836	1823	13	-70.9, 95.3	0.61

n: number of data. L: mean of the low line. H: mean of the high line. D_{L-H} : differences between the low and the high line. HPD_{95%}: highest posterior density region at 95%. p: probability of the difference being >0 when $D_{L-H} > 0$ or being <0 when $D_{L-H} < 0$.

Figure 1 displays the development of body condition from second mating to weaning in the high and the low line. Individual body weight and perirenal fat thickness showed a reduction from mating to delivery in both lines. However, this reduction was lesser in the low line than in the high line. Both lines exhibited a recovery of body reserves from delivery to 10 days after delivery, but the increment was slightly higher in the low line. Body condition showed a decrease from 10 days after delivery to weaning, but the decrease was slightly higher in the low line. We notice that although number of kits at birth was higher in the low line than the high one (8.31 kits vs. 7.77 kits respectively, $p = 0.93$) perirenal fat thickness was higher in the low line than the high one in the critical moments of delivery (7.71 mm versus 7.44 mm, $p = 0.99$) and 10 days after delivery (8.17 mm versus 7.90 mm, $p = 0.99$).

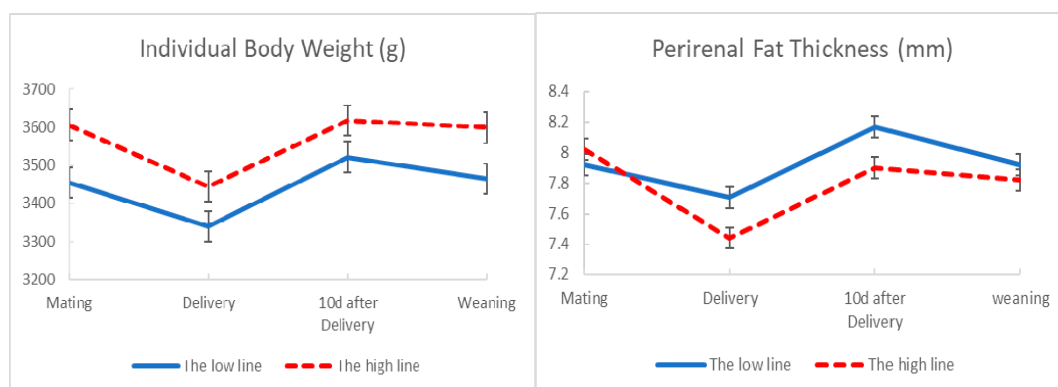


Figure 1. Development of individual body weight and perirenal fat thickness at second mating, delivery, 10 days after delivery and weaning in the low and high lines. The bars show standard deviation.

3.2. Effect of Body Condition on Receptivity and Fertility

Table 2 shows that receptive females had higher individual body weight and perirenal fat thickness than unreceptive females ($+129 \text{ g}$, $p = 0.97$ for body weight; $+0.28 \text{ mm}$, $p = 0.96$ for perirenal fat thickness). Individual body weight and perirenal fat thickness were higher in fertile females compared to unfertile females ($+82 \text{ g}$, $p = 0.94$ for body weight; $+0.28 \text{ mm}$, $p = 0.99$ for perirenal fat thickness).

The probabilities of acceptance of mating and pregnancy were not affected by line and season. However, non-lactating females always showed a higher probability for accepting the male and becoming

pregnant than lactating females (Figures 2 and 3). For a body weight between 2900 and 4400 g, the probability of acceptance of the male ranged from 75% to 100% in non-lactating does and from 65% to 95% in lactating does. For a perirenal fat thickness between 6.0 and 10.0 mm, the probability of acceptance of the male ranged from 80% to 95% in non-lactating does and from 60% to 95% in lactating does. For the same range of weights, the probability of pregnancy extended from 60% to 95% in non-lactating does and from 30% to 60% in lactating does. For the same range of perirenal fat thickness, the probability of pregnancy ranged from 50% to 95% in non-lactating does and from 20% to 80% in lactating does.

Table 2. Features of the marginal posterior distribution of the differences for individual body weight (IBW10d) and perirenal fat thickness (PFT10d) at 10 days after delivery for receptivity and fertility.

	Receptive	Non-Receptive	D	HPD _{95%}	<i>p</i>
IBW10d (g)	3581	3452	129	6.59, 260	0.97
PFT10d (mm)	8.09	7.81	0.28	−0.03, 0.57	0.96
	Fertile	Infertile			
IBW10d (g)	3593	3511	82	−20, 182	0.94
PFT10d (mm)	8.15	7.87	0.28	0.04, 0.52	0.99

D: differences between receptive and non-receptive does or fertile and unfertile does. HPD_{95%}: highest posterior density region at 95%. *p*: probability of the difference being >0 when D > 0 or being <0 when D < 0.

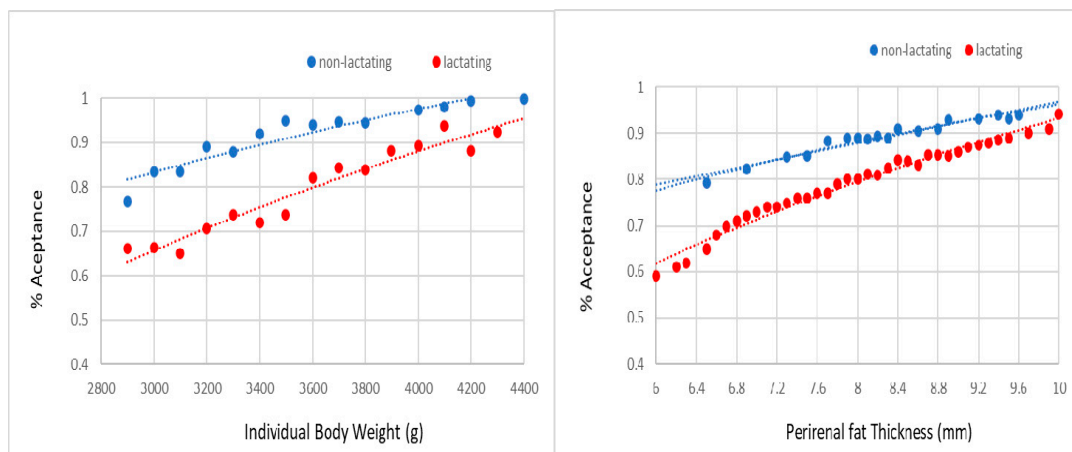


Figure 2. Probability of acceptance of the male at mating on individual body weight and perirenal fat thickness at 10 day after delivery (i.e., third mating in lactating and non-lactating does).

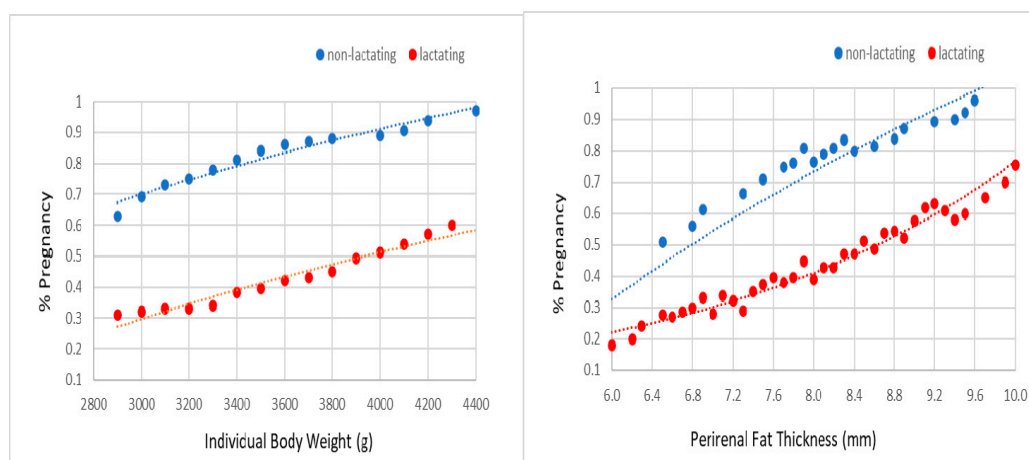


Figure 3. Probability of pregnancy at third gestation on individual body weight and perirenal fat thickness at 10 day after delivery (i.e., third mating, in lactating and non-lactating does).

4. Discussion

4.1. Correlated Response to Selection for Residual Variance

We have found that, as in former generations [12], selection to reduce litter size residual variance produces females with more uniform litters. Uniformity in litter size and body weight has been related to immune response and resistance to diseases (see review [17]). Additionally, we have found that selection for reducing residual variance of litter size increases litter size without affecting the individual weight neither at birth nor at weaning [18].

In relation to development of body condition, we have observed that both lines decrease the body condition from mating to delivery. This is due to the negative energy balance during the last week of gestation, as a consequence of the growing fetuses and the decreasing feed intake in the mother [19]. However, in agreement with previous results from an early experiment in those lines [14], the decrease in body condition at delivery is lower in females from the low line, despite that fact that this line is gestating on average more fetuses.

Immediately after delivery, milk production is low and feed intake is sufficient for covering the nutritional needs for both maintenance and lactation [20]; therefore, body fat reserves are recovered [21]. In accordance with Theilgaard et al. [21], the low and high line increase their body condition between delivery and early lactation; however, the increment is higher in the low line than the high line. A low body condition and high fat mobilization have been related to a high risk of dying or being culled [14,22]; thus, a higher body condition at delivery and a larger fat deposition between delivery from 10 days after delivery in the low line would agree with the lower involuntary elimination rate reported in this line by Argente et al. [11]. In current rabbit production systems, does are mated between 10 and 12 days post-delivery, arriving at the end of weaning with lactation and gestation overlapping [23]. The high energetic needs for milk production and development of fetuses are not entirely compensated with doe's increasing feed intake at the end of weaning (review by Castellini [24]). Therefore, there is an important increase in the mobilization of dam's body reserves, which leads them to lose body condition (review by Castellini et al. [25]). In this sense, we also observed a decrease in body condition between 10 days after delivery and weaning in both lines, although the decrease is slightly higher in the low line due to a large number of kits at weaning [18].

We see that selection to reduce residual variance of litter size has a favorable correlated response in body condition and fat mobilization in the dam, playing an important role in coping to environmental challenges.

4.2. Effect of Body Condition on Receptivity and Fertility

As previously commented, current rabbit breeding programs are based on an interval between delivery and artificial insemination or mating between 10 and 12 days. Therefore, females have to simultaneously allocate their fatness resources for both maintenance and milk production [26], and poor body condition at mating can limit mating success [27]. Several studies have reported a negative effect of lactation on fertilization rate [20,28]. We stress that our study quantifies for the first time the negative effect of lactating on receptivity and fertility. Non-lactating females have from 10% to 20% more probability to accept to mating than lactating females. The effect is even more relevant for fertility. In this regard, probability of becoming pregnant was from 30% to 35% higher in non-lactating females than in lactating females. No differences in receptivity and fertility were found between lines.

These findings support that lactation mobilizes a large amount of doe's fat reserves and has an important effect on receptivity and fertility. Therefore, females must arrive to mate with a good body fatness level which will allow them to have a long and successful reproductive lifespan. The low line showed a greater perirenal fat thickness than the high line at mating (8.17 mm versus 7.90 mm). However, this difference was not enough to result in relevant differences between lines in receptivity and fertility.

5. Conclusions

Selection for litter size variability showed a correlated response between body condition and fat mobilization. The does selected for litter size homogeneity did better in situations with high-energy demand such as delivery and lactation, compared to those selected for increasing litter size variability. This means the animals in the homogenous line had better health and welfare levels.

Author Contributions: Conceptualization M.-J.A. and M.d.l.L.G.; data curation, I.A., M.-J.A. and M.d.l.L.G.; funding acquisition, A.B. and M.-J.A.; formal analysis I.A.; writing—original draft preparation I.A.; writing—review and editing, I.A., M.d.l.L.G., A.B., P.M., M.C., M.-J.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by Project AGL2017-86083-C2-2-P, funding by Ministerio de Ciencia e Innovación (MIC)-Agencia Estatal de Investigación (AEI) and el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Conflicts of Interest: The authors declare that there are no conflicts of interest to this publication.

References

1. Passillé, D.A.M.; Rushen, J. Preslaughter handling|Welfare Including Housing Conditions. In *Encyclopedia of Meat Sciences*, 2nd ed.; Dikeman, M., Devine, C., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2014; pp. 102–107.
2. Colditz, I.G.; Hine, B.C. Resilience in farm animals: Biology, management, breeding and implications for animal welfare. *Anim. Prod. Sci.* **2016**, *56*, 1961–1983. [[CrossRef](#)]
3. Berghof, T.V.L.; Poppe, M.; Mulder, H.A. Opportunities to improve resilience in animal breeding programs. *Front. Genet.* **2019**, *9*, 692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Schröder, U.J.; Staufienbiel, R. Invited Review: Methods to Determine Body Fat Reserves in the Dairy Cow with Special Regard to Ultrasonographic Measurement of Backfat Thickness. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 1–14. [[CrossRef](#)]
5. Maes, D.G.; Janssens, G.P.; Delputte, P.; Lammertyn, A.; de Kruif, A. Backfat measurements in sows from three commercial pig herds: Relationship with reproductive efficiency and correlation with visual body condition scores. *Livestock Prod. Sci.* **2004**, *91*, 57–67. [[CrossRef](#)]
6. Pascual, J.J.; Castella, C.; Cervera, C.; Blas, E.; Fernández-Carmona, J. The use of ultrasound measurement of perirenal fat thickness to estimate changes in body condition of young females rabbits. *Anim. Sci.* **2000**, *70*, 435–442. [[CrossRef](#)]
7. Barletta, R.V.; Maturana Filho, M.; Carvalho, P.D.; Del Valle, T.A.; Netto, A.S.; Rennó, F.P.; Mingoti, R.D.; Gandra, J.R.; Mourão, G.B.; Fricke, P.M.; et al. Association of changes among body condition score during the transition period with NEFA and BHBA concentrations, milk production, fertility, and health of Holstein cows. *Theriogenology* **2017**, *104*, 30–36. [[CrossRef](#)]
8. van Staaveren, N.; Doyle, B.; Manzanilla, E.G.; Calderón Díaz, J.A.; Hanlon, A.; Boyle, L.A. Validation of carcass lesions as indicators for on-farm health and welfare of pigs. *J. Anim. Sci.* **2017**, *95*, 1528–1536. [[CrossRef](#)]
9. Sánchez, J.P.; de la Fuente, L.F.; Rosell, J.M. Health and body condition of lactating females on rabbit farms. *J. Anim. Sci.* **2012**, *90*, 2353–2361. [[CrossRef](#)]
10. Mulder, H.A.; Rashidi, H. Selection on resilience improves disease resistance and tolerance to infections. *J. Anim. Sci.* **2017**, *95*, 3346–3358. [[CrossRef](#)]
11. Argente, M.J.; García, M.L.; Zbyňovká, K.; Petruška, P.; Capcarová, M.; Blasco, A. Correlated response to selection for litter size environmental variability in rabbit's resilience. *Animal* **2019**, *13*, 2348–2355. [[CrossRef](#)]
12. Blasco, A.; Martínez-Álvarez, M.; García, M.L.; Ibáñez-Escriche, N.; Argente, M.J. Selection for environmental variance of litter size in rabbit. *Genet. Sel. Evol.* **2017**, *49*, 48–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Beloumi, D.; Blasco, A.; Muelas, R.; Santacreu, M.A.; García, M.L.; Argente, M.J. Inflammatory correlated response in two lines of rabbit selected divergently for litter size environmental variability. *Animals* **2020**, *10*, 1540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. García, M.L.; Blasco, A.; García, M.E.; Argente, M.J. Correlated response in body condition and energy mobilisation in rabbits selected for litter size variability. *Animal* **2019**, *13*, 784–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Pascual, J.J.; Blanco, J.; Piquer, O.; Quevedo, F.; Cervera, C. Ultrasound measurements of perirenal fat thickness to estimate the body condition of reproducing rabbit does in different physiological status. *World Rabbit Sci.* **2004**, *12*, 7–22. [[CrossRef](#)]

16. Blasco, A. *Bayesian Data Analysis for Animal Scientists*; Springer: New York, NY, USA, 2017.
17. Lung, L.H.D.S.; Carvalheiro, R.; Neves, H.H.D.R.; Mulder, H.A. Genetics and genomics of uniformity and resilience in livestock and aquaculture species: A review. *J. Anim. Breed Genet.* **2020**, *137*, 263–280. [[CrossRef](#)]
18. Agea, I.; García, M.L.; Blasco, A.; Argente, M.J. Litter survival differences between divergently selected lines for environmental sensitivity in rabbits. *Animals* **2019**, *9*, 603. [[CrossRef](#)]
19. Fortun-Lamothe, L. Energy balance and reproductive performance in rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.* **2006**, *93*, 1–15. [[CrossRef](#)]
20. Feugier, A.; Fortun-Lamothe, L. Extensive reproductive rhythm and early weaning improve body condition and fertility of rabbit does. *Anim. Res.* **2006**, *55*, 459–470. [[CrossRef](#)]
21. Theilgaard, P.; Baselga, M.; Blas, E.; Friggens, N.C.; Cercera, C.; Pascual, J.J. Differences in productive robustness in rabbits selected for reproductive longevity or litter size. *Animal* **2009**, *3*, 637–646. [[CrossRef](#)]
22. Theilgaard, P.; Sánchez, J.P.; Pascual, J.J.; Friggens, N.C.; Baselga, M. Effect of body fatness and selection for prolificacy on survival of rabbit does assessed using a cryopreserved control population. *Livest. Sci.* **2006**, *103*, 65–73. [[CrossRef](#)]
23. Arias-Alvarez, M.; Garcia-Garcia, R.M.; Rebollar, P.G.; Revuelta, L.; Millan, P.; Lorenzo, P.L. Influence of metabolic status on oocyte quality and follicular characteristics at different postpartum periods in primiparous rabbit does. *Theriogenology* **2009**, *72*, 612–623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Castellini, C. Reproductive activity and welfare of rabbit does. *Ital. J. Anim. Sci.* **2007**, *6*, 743–747. [[CrossRef](#)]
25. Castellini, C.; Dal Bosco, A.; Arias-Alvarez, M.; Lorenzo, P.L.; Cardinali, R.; Rebollar, P.G. The main factors affecting the reproductive performance of rabbit does: A review. *Anim. Reprod. Sci.* **2010**, *122*, 174–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Xiccato, G.; Bernardini, M.; Castellini, C.; Dalle Zotte, A.; Queaque, P.I.; Trocino, A. Effect of post-weaning feeding on the performance and energy balance of female rabbits at different physiological states. *J. Anim. Sci.* **1999**, *77*, 416–426. [[CrossRef](#)]
27. Cardinali, R.; Dal Bosco, A.; Bonanno, A.; Di Grigoli, A.; Rebollar, P.G.; Lorenzo, P.L.; Castellini, C. Connection between body condition score, chemical characteristics of body and reproductive traits of rabbit does. *Livest. Sci.* **2008**, *116*, 209–215. [[CrossRef](#)]
28. Castellini, C.; Dal Bosco, A.; Cardinali, R. Long term effect of post-weaning rhythm on the body fat and performance of rabbit doe. *Reprod. Nutr. Dev.* **2006**, *46*, 195–204. [[CrossRef](#)]

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



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

6.3. PUBLICACIÓN 3

Litter survival differences between divergently selected lines for environmental sensitivity in rabbits

Iván Agea

María de la Luz García

Agustín Blasco



María José Argente

Animals

<https://doi.org/10.3390/ani9090603>

Article

Litter Survival Differences between Divergently Selected Lines for Environmental Sensitivity in Rabbits

Ivan Agea ¹, María-Luz García ^{1,*}, Agustín Blasco ² and María-José Argente ¹

¹ Departamento de Tecnología Agroalimentaria, Universidad Miguel Hernández de Elche, Ctra de Beniel Km 3.2, 03312 Orihuela, Spain

² Institute for Animal Science and Technology, Universitat Politècnica de València, P.O. Box 22012, 46022 Valencia, Spain

* Correspondence: mariluz.garcia@umh.es; Tel.: +34-966-749-707

Received: 27 July 2019; Accepted: 20 August 2019; Published: 25 August 2019



Simple Summary: Two rabbit lines are divergently selected for increasing or decreasing the variability of litter size at birth. Decreasing the litter size variability produces more resilient females with less sensitivity to diseases, being an indirect selection way to improve environmental sensitivity. The kits' survival rate at weaning was higher in the homogeneous line. Moreover, this line led to a greater uniformity of the kits' weight at weaning, although the weight variability at birth was higher, which could be due to a higher lactation capacity of the homogeneous line.

Abstract: A divergent selection experiment on environmental sensitivity was performed in rabbits. The aim was to estimate the correlated response in kit weight and survival, litter weight, and weight distance from birth to weaning. The weight distance was calculated as the absolute value of the differences between the individual value and the mean value of its litter. The relationship between the probability of survival at 4 d of age, and the weight at birth, was studied. Environmental sensitivity was measured as litter size variability. A total of 2484 kits from 127 does from the low line, and 1916 kits of 114 does from the high line of the 12th generation were weighed. Both of the lines showed similar individual and litter weights at birth and weaning, and a similar survival rate at birth, and at 4 d of age. The survival rate at weaning was higher in the low line (0.67 and 0.62; $P = 0.93$). The weight distance was higher at birth, but lower at weaning in the low line (47.8 g and 54.1 g; $P = 0.98$). When the weight at birth was high, the kits had a higher survival rate. In conclusion, selection for environmental sensitivity showed a correlated response in the kits' survival, and in the homogeneity of litter weight at weaning.

Keywords: correlated response; pre-weaning; survival; weight; welfare

1. Introduction

The aim of genetic selection in maternal rabbit lines has traditionally been to improve the mean of productive traits: Litter size [1], or the length of does' productive life [2,3]. Overall, this intensive selection for the increase of productivity has been successful, but it has also had negative consequences on animal welfare, increasing culling at early ages [4,5]. Consequently, resistance toward disease and stress are current priorities in rabbit breeding, leading to better doe resilience and welfare.

Selection for environmental sensitivity, measured as litter size variability, is an indirect selection methodology for improving resilience and robustness [6,7]. A divergent selection experiment for this trait has been performed with success [6], leading to lines with high and low litter size variability. Higher litter size variability affects the heterogeneity of littermates, which can produce

lower pre-weaning survival rates [8,9]. The aim of this work is to study the correlated response in the pre-weaning survival rates of two rabbit lines, divergently selected for environmental sensitivity.

2. Material and Methods

All experimental procedures involving animals were approved by the Miguel Hernández University of Elche Research Ethics Committee (Reference number 2019/VSC/PEA/0017), in accordance with Council Directives 98/58/EC and 2010/63/EU.

2.1. Animals

A divergent selection experiment for litter size variability was carried out over twelve generations. The selection was based on the phenotypic variance of the litter size of each doe, after correcting the litter size for both year–season and parity–lactation status [6].

All of the animals were reared in the farm of the Miguel Hernández University of Elche (Spain). The rabbits were fed a standard commercial diet (17% crude protein, 16% fiber, 3.5% fat, Nutricun Elite Gra[®], De Heus Nutrición Animal, La Coruña, Spain). Food and water were provided ad libitum. The same feeding conditions were provided for both lactating and non-lactating does. Does were housed in individual cages (37.5 × 33 × 90 cm) under a constant photoperiod of 16 h continuous light: 8 h continuous darkness, and with controlled ventilation throughout the experiment. The experiment took place from December to September. The temperature and relative humidity were recorded every 15 min with a Tinytag data logger (Table 1).

Table 1. Temperature and relative humidity by season.

Season	Temperature (°C)			Relative Humidity (%)		
	Average	Minimum	Maximum	Average	Minimum	Maximum
Winter	14.4	7.5	22.2	63.2	26.6	100
Spring	20.3	15.2	28.6	78.7	43.3	100
Summer	26.9	19.2	33.8	76.9	32.1	100

Does were first mated at 18 weeks of age, and at 10 d after parturition thereafter. Matings took place every week. The nest was made with textile by-products and the doe had free access to the nest, from 2 days before delivery until 21 days after delivery, when the nest was removed. The litters were not standardized, and the kits were weaned at 28 days of age.

Data come from the 12th generation of the selection. The litter size at birth (LS), the number born alive (NBA), the number born dead (NBD), the number of rabbits at 4 days of age (N4), and the number of rabbits at weaning (NW) were recorded. The rabbits were individually weighed and sexed within 24 h after birth. Some of the kits had suckled before being weighed. The milk intake was verified by recording a white mark in the abdominal area. The kits were also weighed at weaning. A total of 2484 kits from 127 does from the low line, and 1916 kits of 114 does from the high line were weighed.

2.2. Traits

The following traits were analyzed: LS; survival at birth (NBA/LS); survival at 4 days of age (N4/NBA); survival at weaning (NW/N4); the individual weight at birth of live and dead kits; the individual weight at weaning; the litter weight at birth of total kits and kits alive; the litter weight at weaning; and the weight distance of live, dead, and weaned rabbits. The weight distance was calculated as the absolute value of the differences between the individual value and the mean value of its litter.

2.3. Statistical Analysis

The model used for analyzing the LS and the litter survival rates was:

$$y_{ijkl} = \mu + L_i + S_j + LP_k + p_{ijkl} + e_{ijkl}$$

where L_i is the line effect with two levels (the high and the low lines); S_j is the season effect with three levels (winter, spring, and summer); LP_k is the lactation–parity effect with five levels (nulliparous, lactating, and non-lactating primiparous doe, and lactating and non-lactating multiparous doe); p_{ijkl} is the dam permanent effect with 241 levels; and e_{ijkl} is the residual term.

The individual weight at birth for the live and dead kits, and their corresponding distance were analyzed using the following model:

$$y_{ijklmnop} = LK_i + S_j + LP_k + IM_l + SE_m + p_{ijklmn} + c_{ijklmno} + b \times LS_{ijklmno} + e_{ijklmnop}$$

where LK_i is the line-survival effect (live kits of the high line, dead kits of the high line, live kits of the low line, and dead kits of the low line); IM_l is the intake of milk effect (whether the kit suckled or not before being weighed); SE_m is the sex effect (male and female); p_{ijklmn} is the dam permanent effect with 241 levels; $c_{ijklmno}$ is the common litter effect with 541 levels; b is the regression coefficient of the covariate; $LS_{ijklmno}$ is the covariate litter size; and $e_{ijklmnop}$ is the residual term.

Litter weights, individual weights at weaning, and the distance were analyzed with the same model, but the line effect with two levels (high and low lines) was used instead of the line-survival effect.

All of the analyses were performed using Bayesian methodology [10]. Bounded uniform priors were used for all effects. The joint prior distribution for the permanent environmental effect of the doe and the common litter effect was $N(0, I \otimes G_p)$, where G_p was the (co)variance matrix between these effects. Residuals prior distribution was $N(0, I \otimes \sigma^2_e)$. Residuals, permanent environmental effects, and common litter effects are uncorrelated. The priors for the variances were also bounded uniform. Features of the marginal posterior distributions for all of the unknowns were estimated using Gibbs sampling. The Threshold Model program was used [11]. We used a chain of 250,000 samples, with a burn-in period of 50,000. Only one out of every 100 samples was saved for inferences. Convergence was tested using the Z criterion of Geweke [12], and Monte Carlo sampling errors were computed using time-series procedures [13].

The relationship between the probability of survival from birth to 4 d of age, and the individual weight at birth was analyzed by logistic regression. The model included line, season, parity–lactation (with three levels: Nulliparous, lactating, and non-lactating does), milk intake, and sex effects. Table 2 shows the number of kits that survived at 4 d of age, classified by weight at birth, and line. The LOGISTIC procedure of the statistical package SAS was used [14].

Table 2. Number of kits at birth (number of kits at 4 d of age) by line effect and individual birth weight (g).

	20–34	35–44	45–54	55–64	65–80
Line H	73 (29)	316 (214)	644 (578)	494 (468)	234 (222)
Line L	128 (54)	339 (226)	756 (652)	661 (609)	338 (321)

3. Results

3.1. Correlated Response to Selection in Litter Survival and Pre-Weaning Weight

Descriptive results of the traits by line are presented in Table 3. The coefficient of variations are moderate and increase from birth to weaning, except for the weight distance, which is high and similar.

Table 3. General mean, standard deviation (SD), coefficient of variation (CV) for litter size at birth, survival, litter weight, individual weight, and weight distance before weaning.

	Line H			Line L		
	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV
Litter size	7.69	2.98	0.38	8.35	2.43	0.29
Survival						
At birth	0.89	0.25	0.28	0.86	0.25	0.29
At 4 days of age	0.88	0.25	0.28	0.87	0.25	0.29
At weaning	0.61	0.34	0.56	0.67	0.34	0.51
Litter weight						
Total at birth (g)	431	118	0.27	450	119	0.26
Live at birth (g)	412	127	0.31	410	128	0.31
At weaning (g)	2518	1183	0.47	2460	1185	0.48
Individual weight						
Live at birth (g)	53.5	11.2	0.21	54.0	11.2	0.21
Dead at birth (g)	46.3	11.2	0.24	46.0	11.1	0.24
At weaning (g)	493	151	0.31	477	150	0.31
Weight distance						
Live at birth (g)	4.9	4.6	0.94	5.4	4.6	0.85
Dead at birth (g)	6.9	4.6	0.67	6.8	4.6	0.67
Weaned (g)	53.3	45.7	0.86	47.8	46.4	0.97

Table 4 shows the features of the estimated marginal posterior distributions of the differences between the lines for litter survival, individual weight, and weight distances at birth and weaning. The litter size at birth was higher in the low line (H-L = -0.6 kits; $P = 1.0$). The survival rate at birth and at 4 d of age were similar between the lines, but the survival at weaning was 5% higher in the low line ($P = 0.93$). Both of the lines showed similar individual weights of kits, and litter weight at birth. There is some evidence that the individual weight at weaning was lower in the low line (H-L = 15 g; $P = 0.82$), but when the litter weight at weaning was considered, both lines showed similar values ($P = 0.78$). The weight distance for live kits at birth was higher in the low line (H-L = -0.5 g; $P = 0.97$); however, the weight distance at weaning was lower in the low line (H-L = 6.3 g; $P = 0.98$).

Table 4. Features of the marginal posterior distribution of the differences between the high and the low litter size variability lines for litter size at birth, survival, litter weight, individual weight, and weight distance before weaning.

	H	L	H-L	HPD _{95%}	P
Litter size					
At birth	7.7	8.3	-0.6	-1.1 ; -0.2	1.00
Survival					
At birth	0.89	0.87	0.02	-0.03 ; 0.06	0.79
At 4 days of age	0.88	0.87	0.01	-0.04 ; 0.05	0.67
At weaning	0.62	0.67	-0.05	-0.12 ; 0.01	0.93
Litter weight					
Total at birth (g)	440	443	-3	-15 ; 8	0.73
Live at birth (g)	409	411	-2	-14 ; 9	0.65
At weaning (g)	2461	2404	57	-84 ; 205	0.78
Individual weight					
Live at birth (g)	53.5	54.1	-0.4	-1.7 ; 0.8	0.75
Dead at birth (g)	46.3	46.1	-0.2	-2.4 ; 1.9	0.60
At weaning (g)	495	480	15	-17 ; 47	0.82
Weight distance					
Live at birth (g)	4.9	5.4	-0.5	-0.9 ; 0.0	0.97
Dead at birth (g)	7.0	6.8	0.2	-0.9 ; 1.3	0.68
Weaned (g)	54.1	47.8	6.3	0.2; 12.3	0.98

H = median of the high line; L = median of the low line; H-L = median of the difference between the high and the low lines; HPD_{95%} = highest posterior density region at 95%; P = probability of the difference being >0 when H-L >0 , and probability of the difference being <0 when H-L <0 .

3.2. Survival at 4 d of Age and Individual Weight at Birth

The probability of survival at 4 d of age, and weight at birth were not affected by sex ($P = 0.47$). Both of the lines showed similar probabilities of survival at 4 d of age, with the same weight at birth ($P = 0.12$; Figure 1). Probabilities of survival asymptotically increased with the individual birth weights, and raised to more than 90% from 60 g onwards.

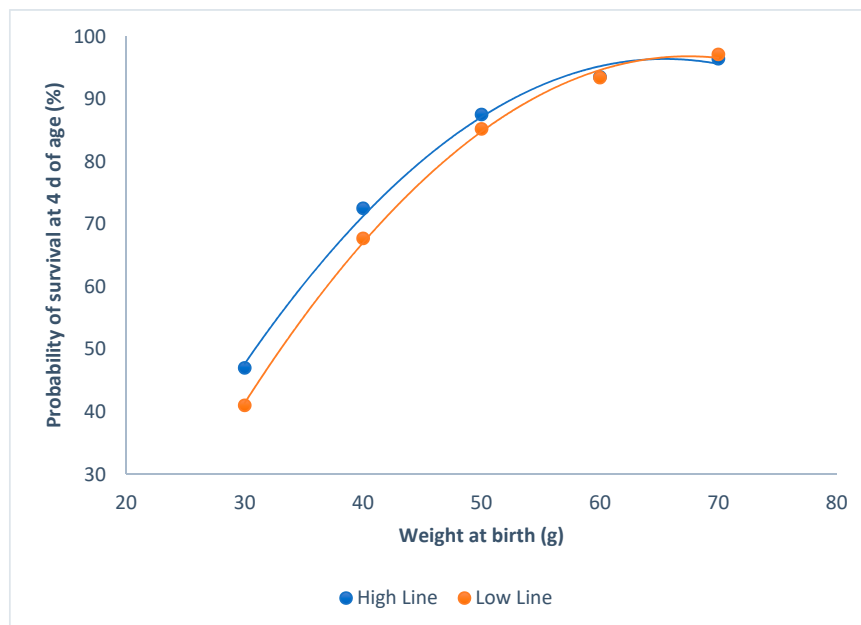


Figure 1. Relationship between survival at 4 d of age and individual birth weights for the high and the low litter size variability lines.

Kits born in winter had less of a probability of survival than those that were born in summer or spring ($P < 0.0001$; Figure 2). When the weight of the kits was higher than 60 g at birth, the probability of survival was at its maximum, regardless of the parity–lactation status of the doe ($P < 0.0001$; Figure 3). The minimum probability of survival took place in the lactating does, when the weights ranged from 30 to 60 g; the non-lactating does showed the highest probability of survival.

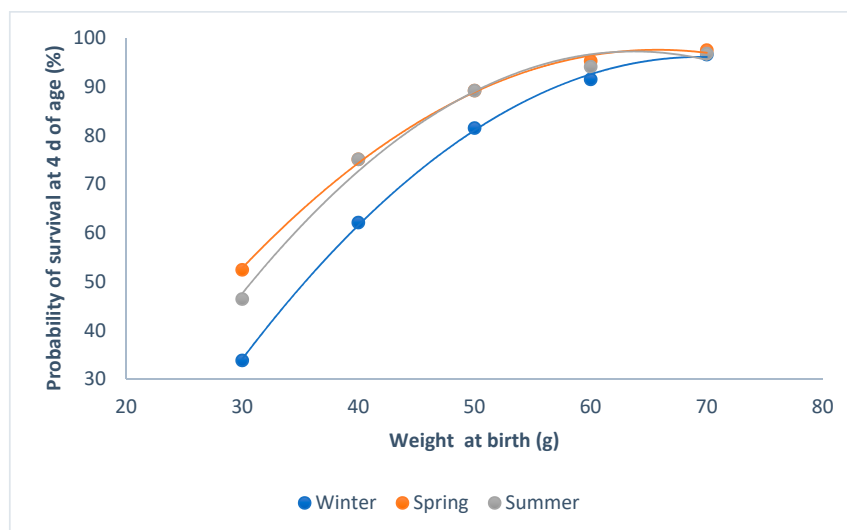


Figure 2. Relationship between survival at 4 d of age and individual birth weight for the seasons.

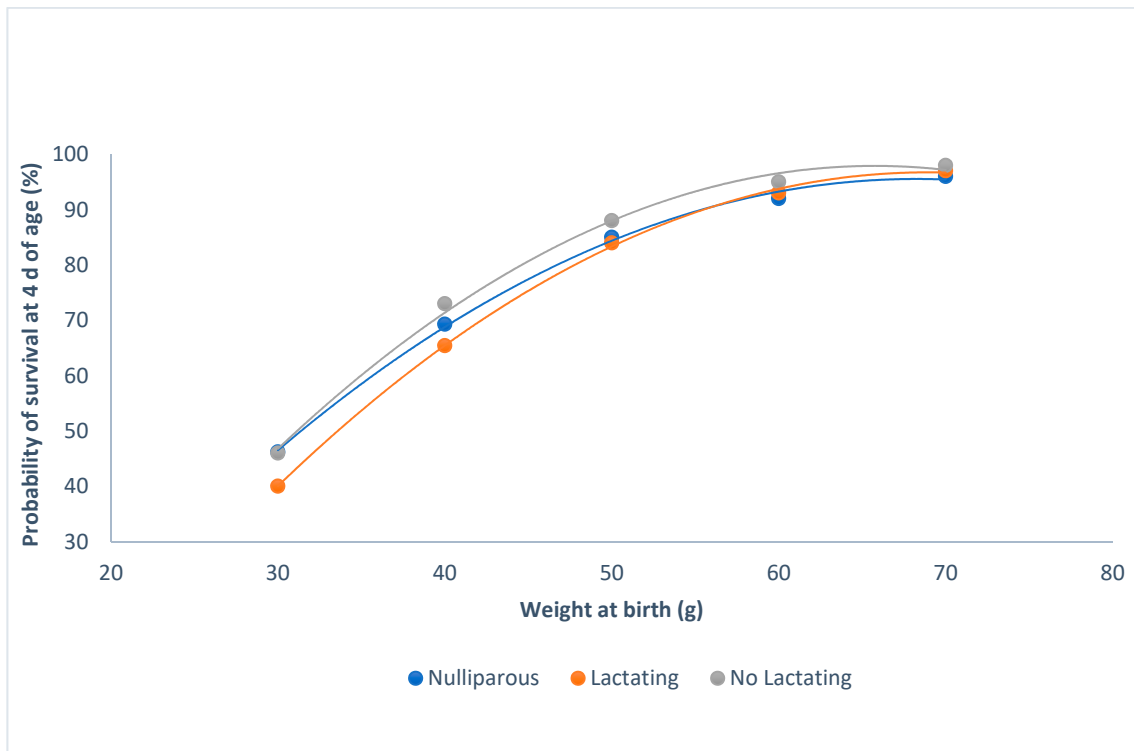


Figure 3. Relationship between survival at 4 d of age and individual birth weight for the parity-lactation status.

Kits that suckled always had a higher probability of survival than the kits that did not suckle ($P < 0.0001$; Figure 4). Kits with the minimum weight had a survival probability of 65% when the rabbits suckled, but only 35% if they did not suckle.

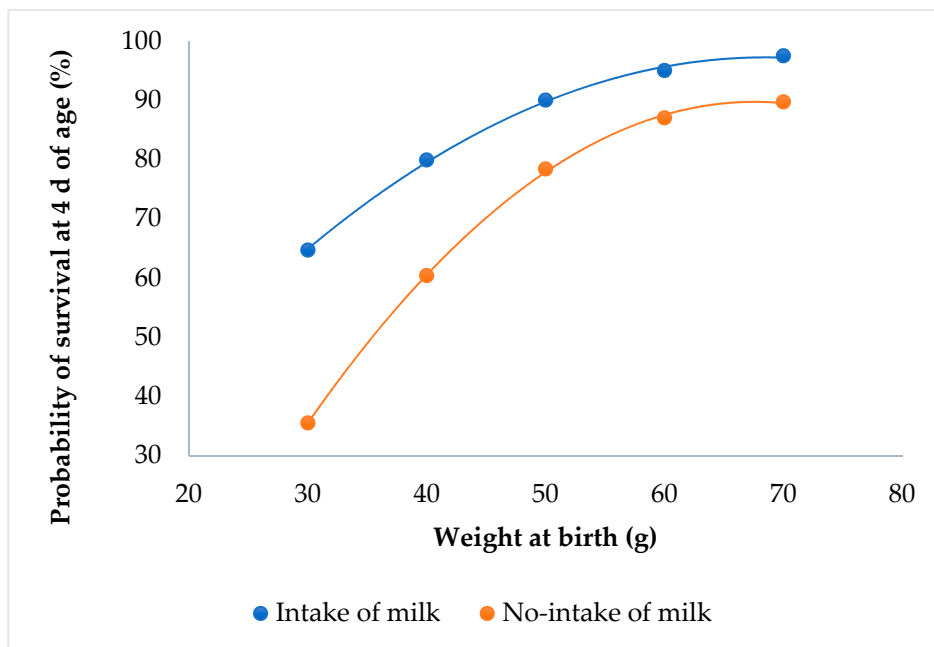


Figure 4. Relationship between survival at 4 d of age and individual birth weight for the milk intake effect.

4. Discussion

4.1. Correlated Response to Selection in Litter Survival and Pre-Weaning Weight

Our divergent selection experiment for environmental sensitivity has shown that this trait is genetically determined [6]. This has implications for animal welfare, as animals that cope better with their environment have better welfare than the more sensitive animals [7]. After correcting for the litter size, both of the lines had similar individual weights at birth, and the survival rates at birth and the survival rates at four days of age were not modified. Moreover, the relationship between the probability of survival at 4 d of age and the weight at birth was not affected by the line.

Weight distance has been used as the dispersion measure, instead of the standard deviation of the weight of the litter, because it provides one record per individual instead of one per litter. It seems that there is a correlated response on both of the weight distances at birth and at weaning, but with opposite sign; the kits' weight is more variable at birth in the low line, but then less variable at weaning. To date, there is no information available on the weight distance at birth in rabbits, but Peiró et al. have shown similar values of weight distance at weaning [15].

Maternal care in the first days after parturition is clearly related to the ingestion of energy by the kits, which is directly related to their survival [16]. So, the higher rate of survival at weaning of the low line could indicate higher milk production, and better maternal behavior during lactation. In spite of the greater variability of weight at birth of the low line, this line produces a greater uniformity of weight at weaning than the high line, perhaps due to a higher lactation capacity of the doe. The homogeneity in weight within the litter is an important trait in prolific species such as rabbits [17], because increasing the weight homogeneity within the litter reduces the competition between littermates, and increases the viability of them [18].

4.2. Survival at 4 d of Age and Individual Weight at Birth

The probability of individual survival at 4 d of age is related to birth weight, as the kits with lower birth weight have a lower probability of survival. Neonates require a protective environment, adequate nutrition, and special maternal care in order to survive [19]. So, the season of birth, the intake of milk, and the parity–lactation status of the doe all affect the likelihood of survival. The probability of survival at 4 d of age was lower in winter than in spring and summer, when the weight at birth was less than 50 g. If the birth weight is less than the optimum weight, the energy reserves and the thermoregulatory capacity are reduced, and the perinatal mortality increases [20]. If the temperature in the nest is low during their first five days of life, the instantaneous energy production capacity of the young rabbits is insufficient, being unable to compensate for thermal losses through the skin, and the probability of survival decreases [21].

The kits' fat tissue is high at birth, and decreases thereafter [22]. The ingestion of milk immediately after birth allows the rabbit to save fat tissue, and thus significantly increase its chances of survival [23,24]. The lack of a milk spot at birth increases the mortality of the kits at 4 d of age, irrespective of their birth weight. Similar results were obtained at the first week of age [24,25].

When lactation and gestation were overlapping, the probability of survival was lower than in nulliparous and non-lactating does. It is well known that does undergo a nutritional deficit when lactation and pregnancy overlap [26,27], and that this deficit affects the probability of the kits' survival.

5. Conclusions

The low line leads to a greater uniformity of kit weight at weaning than the high line, although the variability of weight at birth is higher, which could be due to a higher lactation capacity of the doe. In conclusion, selection for litter size variability shows a negative correlated response in the uniformity of weights at birth, and a positive correlated response in survival and the uniformity of weights at weaning, without affecting individual and litter weight.

Author Contributions: Conceptualization, M.-L.G., M.-J.A., A.B.; data curation, I.A.; formal analysis: M.-L.G., M.-J.A.; funding acquisition, A.B., M.-J.A.; methodology, I.A., M.-L.G., M.-J.A.; writing and editing, I.A., M.-L.G., A.B.

Funding: This study is supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) with the Projects AGL2017- 86083, C2-1-P and C2-2-P.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- García, M.; Baselga, M. Estimation of genetic response to selection in litter size of rabbits using a cryopreserved control population. *Livest. Prod. Sci.* **2002**, *74*, 45–53. [CrossRef]
- Sánchez, J.P.; Theilgaard, P.; Mínguez, C.; Baselga, M. Constitution and evaluation of a long-lived productive rabbit line. *J. Anim. Sci.* **2008**, *86*, 515–525. [CrossRef] [PubMed]
- Larzul, C.; Ducrocq, V.; Tudela, F.; Juin, H.; Garreau, H. The length of productive life can be modified through selection: An experimental demonstration in the rabbit. *J. Anim. Sci.* **2014**, *92*, 2395–2401. [CrossRef] [PubMed]
- Rauw, W.M.; Kanis, E.; Noordhuizen-Stassen, E.N.; Grommers, F.J. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: A review. *Livest. Prod. Sci.* **1998**, *56*, 15–33. [CrossRef]
- Rosell, J.; De La Fuente, L. Culling and mortality in breeding rabbits. *Prev. Vet. Med.* **2009**, *88*, 120–127. [CrossRef] [PubMed]
- Blasco, A.; Martínez-Álvaro, M.; García, M.L.; Ibáñez-Escriche, N.; Argente, M.J. Selection for genetic environmental sensitivity of litter size in rabbits. *Genet. Sel. Evol.* **2017**, *49*, 48–55. [CrossRef] [PubMed]
- Argente, M.J.; García, M.L.; Zbyňovská, K.; Petruška, P.; Capcarová, M.; Blasco, A. Correlated response to selection for litter size environmental variability in rabbits' resilience. *Animal* **2019**. [CrossRef]
- Bolet, G.; Esparbié, J.; Falières, J. Relations entre le nombre de foetus par corne utérine, la taille de portée à la naissance et la croissance pondérale des lapereaux. *Ann. Zootech.* **1996**, *45*, 185–200. [CrossRef]
- Poignier, J.; Szendró, Z.S.; Levai, A.; Radnai, I.; Biro-Nemeth, E. Effect of birth weight and litter size on growth and mortality in rabbit. *World Rabbit Sci.* **2000**, *8*, 103–109. [CrossRef]
- Blasco, A.; Blasco, P.D.A. *Bayesian Data Analysis for Animal Scientists*; Springer International Publishing: New York, NY, USA, 2017.
- Legarra, A.; Varona, L.; López de Maturana, E. TM Threshold Model. Available online: <http://snp.toulouse.inra.fr/~jalegarra/manualtm.pdf> (accessed on 5 July 2019).
- Sorensen, D.; Gianola, D. *Likelihood, Bayesian, and MCMC Methods. Quantitative Genetics*, 1st ed.; Springer: New York, NY, USA, 2002.
- Geyer, C.M. Practical markov chain Monte Carlo (with discussion). *Stat. Sci.* **1992**, *7*, 467–511.
- SAS. *SAS/STAT User's Guide 9.4*; SAS Institute: Cary, NC, USA, 2017.
- Peiró, R.; Badawy, A.Y.; Blasco, A.; Santacreu, M.A. Correlated responses on growth traits after two-stage selection for ovulation rate and litter size in rabbits. *Animal* **2019**. [CrossRef] [PubMed]
- Pascual, J.J.; Savietto, D.; Cervera, C.; Baselga, M. Resources allocation in reproductive rabbit does: A review of feeding and genetic strategies for suitable performance. *World Rabbit. Sci.* **2013**, *21*, 123–144. [CrossRef]
- Bolet, G.; Garreau, H.; Joly, T.; Theau-Clément, M.; Falières, J.; Hurtaud, J.; Bodin, L. Genetic homogenisation of birth weight in rabbits: Indirect selection response for uterine horn characteristics. *Livest. Sci.* **2007**, *111*, 28–32. [CrossRef]
- Garreau, H.; Bolet, G.; Larzul, C.; Robert-Granié, C.; Saleil, G.; SanCristobal, M.; Bodin, L. Results of four generations of a canalising selection for rabbit birth weight. *Livest. Sci.* **2008**, *119*, 55–62. [CrossRef]
- Hamilton, H.H.; Lukefahr, S.D.; McNitt, J.I. Maternal nest quality and its influence on litter survival and weaning performance in commercial rabbits. *J. Anim. Sci.* **1997**, *75*, 926. [CrossRef]
- García-Ximénez, F.; Vicente, J.; Viudes-De-Castro, M. Neonatal performances in 3 lines of rabbit (litter sizes, litter and individual weights). *Anim. Res.* **1995**, *44*, 255–261.
- Hull, D.; Segall, M.M. The contribution of brown adipose tissue to heat production in the new-born rabbit. *J. Physiol.* **1965**, *181*, 449–457. [CrossRef]

22. Spencer, S.A.; Hull, D. The effect of over-feeding newborn rabbits on somatic and visceral growth, body composition and long-term growth potential. *Br. J. Nutr.* **1984**, *51*, 389–402. [[CrossRef](#)]
23. Venge, O. The influence of nursing behaviour and milk production n early growth in rabbits. *Anim. Behav.* **1963**, *11*, 500–506. [[CrossRef](#)]
24. Schaal, B.; Coudert, P.; Rideaud, P.; Fortun-Lamothe, L.; Hudson, R.; Orgeur, P. Immediate postnatal sucking in the rabbit: Its influence on pup survival and growth. *Reprod. Nutr. Dev.* **2000**, *40*, 19–32.
25. Argente, M.; Santacreu, M.; Climent, A.; Blasco, A. Phenotypic and genetic parameters of birth weight and weaning weight of rabbits born from unilaterally ovariectomized and intact does. *Livest. Prod. Sci.* **1999**, *57*, 159–167. [[CrossRef](#)]
26. Xiccato, G.; Trocino, A.; Sartori, A.; Queaque, P.I. Effect of parity order and litter weaning age on the performance and body energy balance of rabbit dos. *Livest. Prod. Sci.* **2004**, *16*, 239–251. [[CrossRef](#)]
27. Rebollar, P.; Pérez-Cabal, M.; Pereda, N.; Lorenzo, P.L.; Arias-Álvarez, M.; García-Rebollar, P. Effects of parity order and reproductive management on the efficiency of rabbit productive systems. *Livest. Sci.* **2009**, *121*, 227–233. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La varianza ambiental es una medida que evalúa la sensibilidad de los individuos a los desafíos del entorno. Esta componente de variabilidad está influenciada por factores genéticos y ha sido objeto de selección en especies como el conejo (Blasco *et al.*, 2017; Garreau *et al.*, 2008) y el ratón (Formoso-Rafferty *et al.*, 2016). La inclusión de la varianza ambiental en los programas de mejora genética animal puede contribuir a homogeneizar la producción en las explotaciones, puesto que su reducción minimiza las diferencias entre individuos. Además, se ha observado que la disminución de la varianza ambiental se relaciona positivamente con características productivas como el peso al nacimiento en cerdo (Sell-Kubiak *et al.*, 2015) y la producción de leche en vacuno (Poppe *et al.*, 2021). Asimismo, se ha encontrado una correlación negativa entre la varianza ambiental y las características indicadoras de resiliencia de los animales, tal es el caso de la salud en vacuno (Elgersma *et al.*, 2018) y en conejo (Argente *et al.*, 2019). Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar la varianza ambiental en los programas de selección para mejorar la adaptabilidad y el bienestar de los animales.

En esta tesis se emplearon animales de un experimento de selección divergente en conejo con el objetivo de modificar la variabilidad ambiental del tamaño de camada durante 12 generaciones en la Universidad Miguel Hernández de Elche. Las dos líneas de conejos utilizadas fueron criadas en condiciones ambientales idénticas y comparten una base genética común. Por tanto, las diferencias fenotípicas observadas entre estas líneas se deben exclusivamente a diferencias genéticas. El criterio de selección utilizado se basó en la varianza del tamaño de camada, corrigiendo previamente el tamaño de camada por dos efectos fijos: año-estación y estado de parto-lactación.

Se debe destacar que es el primer experimento en el que se selecciona directamente por la varianza ambiental, considerándola como un carácter observado. Tras 10 generaciones de selección, se obtuvo una respuesta a la selección equivalente al 4,5% de la media de la varianza ambiental de la generación base por generación (Blasco *et al.*, 2017).

Estudios previos realizados por Argente *et al.* (2019) y Beloumi *et al.* (2020) han demostrado que las hembras de la línea homogénea, caracterizadas por un tamaño de camada más homogéneo, presentan una mayor resistencia al estrés y una mejor capacidad de enfrentarse a enfermedades. Además, Casto-Rebollo *et al.* (2023) han desarrollado el primer estudio que demuestra que la selección para la variabilidad ambiental del tamaño de camada puede modificar la composición del microbioma intestinal. Los resultados revelaron diferencias en la composición del microbioma relacionadas con la modulación de la inmunidad intestinal, lo que podría contribuir a las diferencias de resiliencia entre las poblaciones de conejos. Así pues, la selección divergente basada en la variabilidad del tamaño de camada se ha revelado como una metodología eficaz para mejorar la resiliencia en poblaciones animales.

La evaluación del estrés comúnmente implica medir los niveles de cortisol en diversas matrices biológicas, como el plasma sanguíneo, las heces, el pelo y la orina (Ataallahi *et*

al., 2022). En nuestras líneas de conejos, se cuantificaron específicamente los niveles de cortisol en el plasma sanguíneo de hembras nulíparas de la octava generación (Argente *et al.*, 2019). La línea heterogénea presentó niveles de cortisol basales más altos (0,2 ng/mL) en comparación con la línea homogénea, tanto en condiciones normales como después de la administración de ACTH (0,7 ng/mL). Sin embargo, en generaciones posteriores, ambas líneas mostraron niveles de cortisol similares en hembras primíparas (Beloumi *et al.*, 2020). Se ha de tener en cuenta que el análisis de la concentración de cortisol en sangre plantea dificultades debido a la variabilidad interindividual en la liberación y eliminación de cortisol.

Para evaluar el estrés en conejos se propuso un método no invasivo alternativo: la medición de la emisividad de la temperatura ocular mediante termografía de infrarrojos. En este estudio, que dio lugar al primer artículo de la tesis, las dos líneas de conejos exhibieron patrones distintos en la evolución de la temperatura ocular después de un estímulo estresante, como la monta. Específicamente, la temperatura ocular aumentó un 3,2% en la línea heterogénea (35,81 °C temperatura basal a 36,95 °C temperatura a los 30 minutos tras la monta), mientras que solo se incrementó un 1,8% en la línea homogénea (35,69 °C temperatura basal a 36,32 °C a los 5 minutos después de la monta). Estos resultados han sido avalados recientemente en los machos de las líneas (Serrano-Jara *et al.*, 2024). En este caso, se midió la temperatura ocular basal, a un minuto y a 5 minutos después de realizar una extracción de semen. La línea homogénea mostró una temperatura basal más baja que la línea heterogénea tanto en condiciones de confort térmico (36,46 °C vs. 36,77 °C; P = 92%), como con estrés térmico (37,13 °C vs. 37,78 °C; P ≤ 99%). Estas diferencias se mantuvieron hasta el primer minuto. Investigaciones previas han establecido una asociación positiva entre una mayor emisividad de temperatura y niveles elevados de estrés en conejos (de Lima *et al.*, 2013; Jaén-Téllez *et al.*, 2021; Marai *et al.*, 2001). Por lo tanto, este estudio proporciona nueva evidencia que confirma los niveles más bajos de estrés observados en la línea homogénea.

La variación de emisividad de temperatura es diferente en función de la especie animal estudiada y del estímulo utilizado. Este estudio también investigó por primera vez la evolución de la temperatura ocular en conejos tras la aplicación de un estímulo estresante. Se midió la temperatura a los 5, 30 y 60 min posteriores a la monta. La temperatura ocular se mantuvo superior a la temperatura basal incluso a los 60 min. Sin embargo, estudios recientes realizados en los machos de estas líneas mostraron que la máxima temperatura del globo ocular se presenta al minuto de aplicar el estímulo estresante, que en este caso fue la obtención de una muestra de semen mediante vagina artificial (Serrano-Jara *et al.*, 2023). En otras especies, como el caballo de carreras, la emisividad de temperatura es mayor a la basal desde 5 min antes de la competición hasta 3 horas después (Valera *et al.*, 2012; Bartolomé *et al.*, 2013). Por otro lado, en ratas, la temperatura ocular vuelve a los niveles basales 14 min después del estímulo estresante (Vianna y Carrive, 2005).

La condición corporal ha sido ampliamente utilizada para evaluar la movilización de las reservas corporales en animales productivos, incluyendo el ganado vacuno (Schröder y

Staufenbiel, 2006), el ganado porcino (Maes *et al.*, 2004) y el conejo (Pascual *et al.*, 2000). Este indicador se considera relevante para el bienestar animal, ya que está relacionado con la fertilidad y la predisposición del animal a enfermar y ser eliminado (Barletta *et al.*, 2017 en vacuno; Van Staaveren *et al.*, 2017 en porcino; Sánchez *et al.*, 2012 en conejos). Por lo tanto, la monitorización de la condición corporal podría ser un indicador valioso para evaluar la resiliencia de los animales.

Para el segundo artículo de esta tesis, se investigó la respuesta a la selección por variabilidad del tamaño de camada y la respuesta correlacionada en el tamaño de camada de los tres primeros partos, en el peso a los 28 días y a los 63 días de edad de la hembra y en la condición corporal de la hembra desde la monta hasta el destete en conejos. Los resultados confirman la respuesta directa a la selección previamente observada en generaciones anteriores (Blasco *et al.*, 2017), ya que la línea heterogénea presentó una variabilidad en tamaño de camada de 4,23 gazapos² por camada, mientras que la línea homogénea tuvo un valor de 2,78 gazapos² por camada ($P = 100\%$). Además, se observó que la línea homogénea logró incrementar el tamaño de camada en los tres primeros partos, sin afectar el peso individual de la hembra a los 28 días y a los 63 días de edad. La diferencia en el tamaño de camada entre la línea homogénea frente a la heterogénea fue de + 0,42, + 0,54 y + 0,66 gazapos para el primer, segundo y tercer parto respectivamente ($P > 90\%$).

En cuanto a la evolución de la condición corporal, ambas líneas experimentaron una disminución del espesor de la grasa perirrenal desde la monta hasta el parto. Este resultado era esperado ya que, en la última semana de gestación, las hembras presentan un balance energético negativo debido al rápido crecimiento de los fetos en el último tercio de la gestación y a la disminución en la ingesta de alimento por parte de la madre (Fortun-Lamothe, 2006). Sin embargo, confirmando estudios previos en estas líneas (García *et al.*, 2019), se observó que la disminución de la condición corporal al parto fue menor en la línea homogénea tanto en peso individual de la coneja como en espesor de grasa perirrenal, a pesar de que esta línea estaba gestando un mayor número de fetos (Argente *et al.*, 2017).

En este estudio, se investigaron los efectos de la movilización de reservas corporales en la condición corporal y la supervivencia de conejas lactantes. Durante los primeros días de lactación, la producción de leche es baja, y la ingesta de alimento por parte de las conejas lactantes cubre las necesidades nutricionales tanto para el mantenimiento como para la lactancia (Feugier y Fortun-Lamothe, 2006). Por lo tanto, las hembras pueden recuperar sus reservas corporales durante este período (Theilgaard *et al.*, 2009).

Ambas líneas de conejas experimentaron una recuperación similar de reservas corporales desde el parto hasta los 10 días después del parto, pero teniendo la línea homogénea un mayor espesor de grasa perirrenal tanto al parto (7,71 mm la línea homogénea frente 7,44 mm línea heterogénea, $P = 99\%$) como a los 10 días postparto (8,17 mm la línea homogénea frente 7,90 mm línea heterogénea, $P = 99\%$). La menor condición corporal y

la mayor movilización de reservas corporales en este momento se han relacionado con una mayor tasa de mortalidad y una menor probabilidad de supervivencia después del parto o una mayor tasa de eliminación debido a problemas sanitarios (Theilgaard *et al.*, 2006; García *et al.*, 2019). Estos hallazgos son consistentes con investigaciones previas en estas líneas (Argente *et al.*, 2019).

El ritmo reproductivo utilizado en este experimento fue semi-intensivo, con montas realizadas 10-12 días después del parto (Castellini *et al.*, 2010), lo que resultó en un solapamiento entre la lactación y la gestación. Al momento del destete, se produce una alta demanda energética tanto para la producción de leche como para el desarrollo de los fetos en gestación. Esta demanda energética no puede ser completamente cubierta por la ingesta de alimento de la hembra, lo que da lugar a la movilización de las reservas corporales (Castellini, 2007; Castellini *et al.*, 2010). Los resultados de este estudio indicaron una disminución de la condición corporal desde los 10 días después del parto hasta el destete en ambas líneas, siendo esta disminución ligeramente superior en la línea homogénea, posiblemente debido a un mayor número de gazapos al destete en esta línea.

Desde el inicio de la selección divergente de las líneas, se observó que la línea homogénea consistentemente produjo camadas más numerosas que la línea heterogénea. Blasco *et al.* (2017) encontraron una diferencia de 0,8 gazapos en la generación 10 en favor de la línea homogénea, mientras que en la generación 12, correspondiente a los animales estudiados para esta tesis, la línea homogénea presentó 0,6 gazapos adicionales al parto en comparación con la línea heterogénea.

Los estudios sobre los componentes del tamaño de camada revelaron que ambas líneas exhiben una tasa de ovulación similar. Sin embargo, se observaron diferencias en las primeras etapas del desarrollo embrionario. La línea homogénea mostró un mayor porcentaje de embriones normales y un desarrollo embrionario más avanzado a partir de las 48 horas después de la monta (García *et al.*, 2016; Calle *et al.*, 2017). Estas diferencias persistieron hasta la implantación, con la línea homogénea presentando +1,23 embriones más que la línea heterogénea y una mayor supervivencia embrionaria (+7%; Argente *et al.*, 2017). A pesar de este mayor hacinamiento uterino en la línea homogénea, no se observó una penalización en la supervivencia prenatal. Como resultado, la línea homogénea exhibió un mayor tamaño de camada al parto (Argente *et al.*, 2017).

El tercer artículo de esta tesis se centró en la evolución de las diferencias en el peso individual del gazapo al nacimiento y la supervivencia durante la lactación en ambas líneas. Se propuso una medida alternativa de dispersión del peso de los gazapos utilizando la distancia individual del peso, en lugar de la desviación estándar (Peiró *et al.*, 2021). La elección de esta medida se basa en la consideración de que, en el primer caso, se obtiene un dato por individuo, mientras que, en el segundo, se tiene un dato por camada.

Los resultados revelaron una respuesta correlacionada tanto en la distancia del peso al nacimiento como en el peso al destete. Las diferencias en estas distancias presentaron signos opuestos entre el nacimiento y el destete. Específicamente, la distancia del peso al

nacimiento en la línea homogénea fue superior a la de la línea heterogénea (5,4 g vs. 4,9 g), sin embargo, fue menor al destete (47,8 g vs. 54,1 g). Estos resultados sugieren una mayor variabilidad del peso del gazapo al nacimiento en la línea homogénea frente a los gazapos de la línea heterogénea que se invierte al destete.

En la bibliografía, sólo se ha encontrado un trabajo previo que mida la distancia del peso de los gazapos al destete. En él, Peiró *et al.* (2019) estudiaron la respuesta correlacionada en la distancia del peso de los gazapos al destete en una línea seleccionada por tasa de ovulación y tamaño de camada y encontraron valores similares a los encontrados en nuestras líneas (50 g).

Al evaluar la supervivencia de los gazapos al destete, nuestros resultados indicaron que la línea homogénea presentó una supervivencia un 5% superior en comparación con la línea heterogénea ($P = 93\%$). El comportamiento maternal durante los primeros días después del parto se relaciona directamente con la ingesta de energía de los gazapos, lo que a su vez afecta su supervivencia. Una mayor supervivencia al destete en la línea homogénea podría estar relacionada con una mayor producción de leche y un mejor comportamiento maternal en comparación con la línea heterogénea.

Además, aunque la línea homogénea mostró una mayor variabilidad de peso de la camada al nacimiento, al llegar al destete, esta línea exhibió una mayor uniformidad en el peso de los gazapos dentro de una misma camada. Esta uniformidad podría estar relacionada con una mayor capacidad de producción de leche por parte de las hembras. El carácter de homogeneidad del peso de los gazapos dentro de una camada es considerado relevante en especies prolíficas, como el conejo (Bolet *et al.*, 2007) y el cerdo (Canario *et al.*, 2010), ya que una mayor uniformidad reduce la competencia entre los gazapos de la misma camada y aumenta la probabilidad de supervivencia (Garreau *et al.*, 2008).

8. CONCLUSIONES

La selección para la varianza residual del tamaño de la camada mostró una respuesta correlacionada en la temperatura corporal de las hembras. Las hembras seleccionadas para reducir la variabilidad del tamaño de camada mostraron un menor incremento de temperatura después de un estímulo estresante, lo que sugeriría un mayor bienestar de estas hembras. Este estudio debe considerarse preliminar y será necesario realizar estudios adicionales para confirmar estos resultados.

La selección para la variabilidad del tamaño de camada mostró una respuesta correlacionada en la condición corporal y la movilización de grasa. Las hembras seleccionadas por la homogeneidad del tamaño de la camada se desempeñaron mejor en situaciones de alta demanda de energía, como el parto y la lactancia, en comparación con las seleccionadas para aumentar la variabilidad del tamaño de la camada. Esto significa que los animales de la línea homogénea tuvieron mejores niveles de salud y bienestar.

La línea homogénea proporcionó una mayor uniformidad del peso de los gazapos al destete que la línea heterogénea, lo que podría deberse a una mayor producción y calidad de leche y mejor capacidad maternal de la hembra. La selección por variabilidad en el tamaño de la camada mostró una respuesta correlacionada negativa en la uniformidad de pesos al nacimiento y una respuesta correlacionada positiva en la supervivencia y la uniformidad de pesos al destete, sin afectar el peso del individuo y de la camada.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdelkrim, A.B., Tribout, T., Martin, O., Boichard, D., Ducrocq, V. y Friggens, N.C. (2021). Exploring simultaneous perturbation profiles in milk yield and body weight reveals a diversity of animal responses and new opportunities to identify resilience proxies. *Journal of Dairy Science*, 104(1), 459-470. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18537>.
2. Alexa, A.I., Zamfir, C.L., Bogdănici, C.M., Oancea, A., Maștaleru, A., Abdulan, I.M., Brănișteanu, D.C., Ciobîcă, A., Balmuş, M., Stratulat-Alexa, T., Ciuntu, R.E., Severin, F., Mocanu, M., y Leon, M.M. (2023). The Impact of Chronic Stress on Behavior and Body Mass in New Animal Models. *Brain Sciences*, 13(10), 1492. <https://doi.org/10.3390/brainsci13101492>.
3. Argente, M.J., Calle, E.W., García, M.L. y Blasco, A. (2017). Correlated response in litter size components in rabbits selected for litter size variability. *Journal of animal breeding and genetics*, 134(6), 505-511. <https://doi.org/10.1111/jbg.12283>.
4. Argente, M.J., García, M.L., Zbyňovská, K., Petruska, P., Capcaravá, M. y Blasco, A. (2019). Correlated response to selection for litter size environmental variability in rabbits's resilience. *Animal*, 13(10), 2348-2355. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000302>.
5. Aslani, S., Harb, M.R., Costa, P.S., Almeida, O.F., Sousa, N. y Palha, J.A. (2014). Day and night: diurnal phase influences the response to chronic mild stress. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8, 82. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00082>.
6. Ataallahi, M., Nejad, J.G. y Park, K.H. (2022). Selection of appropriate biomatrices for studies of chronic stress in animals: A review. *Journal of Animal Science and Technology*, 64(4), 621. <https://doi.org/10.5187/jast.2022.e38>.
7. Barletta, R.V., Maturana Filho, M., Carvalho, P.D., Del Valle, T.A., Netto, A.S., Rennó, F.P., y Wiltbank, M.C. (2017). Association of changes among body condition score during the transition period with NEFA and BHBA concentrations, milk production, fertility, and health of Holstein cows. *Theriogenology*, 104, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.030>.
8. Bartolomé, E., Sánchez, M.J., Molina, A., Schaefer, A.L., Cervantes, I. y Valera, M. (2013). Using eye temperature and heart rate for stress assessment in young horses competing in jumping competitions and its possible influence on sport performance. *Animal*, 7(12), 2044-2053. <https://doi.org/10.1017/S1751731113001626>.
9. Belloumi, D., Argente, M.J., García, M.L., Blasco, A. y Santacreu, M.A. (2021). Study of biomarkers of disease sensitivity in a robust and standard maternal line. En: Proceedings of the 12th World Rabbit Congress, 1-3 July. Nantes, France.

10. Beloumi, D., Blasco, A., Muelas, R., Santacreu, M.A., García, M.L. y Argente, M.J. (2020). Inflammatory correlated response in two lines of rabbit selected divergently for litter size environmental variability. *Animals*, 10, 1540. <https://doi.org/10.3390/ani10091540>.
11. Bengtsson, C., Thomasen, J.R., Kargo, M., Bouquet, A. y Slagboom, M. (2022). Emphasis on resilience in dairy cattle breeding: Possibilities and consequences. *Journal of Dairy Science*, 105(9), 7588-7599. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21049>.
12. Berghof, T.V., Poppe, M. y Mulder, H.A. (2019a). Opportunities to improve resilience in animal breeding programs. *Frontiers in genetics*, 9, 692. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00692>.
13. Berghof, T.V. y Bovenhuis, H. (2019b). Body weight deviations as indicator for resilience in layer chickens. *Frontiers in genetics*, 10, 482689. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01216>.
14. Black, P. H., y Garbutt, L. D. (2002). Stress, inflammation and cardiovascular disease. *Journal of psychosomatic research*, 52(1), 1-23. [https://doi.org/10.1016/S0022-3999\(01\)00302-6](https://doi.org/10.1016/S0022-3999(01)00302-6).
15. Blasco, A. (2017). *Bayesian data analysis for animal scientists* (Vol. 265). New York, NY, USA: Springer.
16. Blasco, A., Martínez-Álvaro, M., García, M.L., Ibáñez-Escriche, N. y Argente, M.J. (2017). Selection for environmental variance of litter size in rabbits. *Genetics Selection Evolution*, 49, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12711-017-0323-4>.
17. Blasco, A., Martínez-Álvaro, M., García, M.L., Capcarova, M., Zbynovska, K., Petruscka, P., Ibáñez-Escriche, N. y Argente, M.J. (2018). En: *Proceedings in World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. Vol. Challenges Genotype by Environment Interactions: 89.
18. Bloemhof, S., Van der Waaij, E.H., Merks, J.W.M. y Knol, E.F. (2008). Sow line differences in heat stress tolerance expressed in reproductive performance traits. *Journal of Animal Science*, 86(12), 3330-3337. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-0862>.
19. Bodin, L., Bolet, G., Garcia, M., Garreau, H., Larzul, C. y David, I. (2010a). Robustesse et canalisation: vision de généticiens. *INRA Productions Animales*, 23(1), 11-22. <https://hal.science/hal-01193556>.
20. Bodin, L., Garcia, M., Saleil, G., Bolet, G. y Garreau, H. (2010b). Results of 10 generations of canalising selection for rabbit birth weight. En: *Proceedings of 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, August, Leipzig, Germany, 0391.

21. Bolet, G., Garreau, H., Joly, T., Theau-Clement, M., Falieres, J., Hurtaud, J. y Bodin, L. (2007). Genetic homogenisation of birth weight in rabbits: Indirect selection response for uterine horn characteristics. *Livestock Science*, *111*, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.11.012>.
22. Bonanno, A., Mazza, F., Grigoli, A.D. y Alicata, M.L. (2008). Body condition score and related productive responses in rabbit does. En: Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, 10-13 June. Verona, Italy.
23. Brito, L.F., Oliveira, H.R., McConn, B.R., Schinckel, A.P., Arrazola, A., Marchant-Forde, J.N. y Johnson, J.S. (2020). Large-scale phenotyping of livestock welfare in commercial production systems: A new frontier in animal breeding. *Frontiers in genetics*, *11*, 793. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00793>.
24. Broom, D. M. (1988). The scientific assessment of animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, *20*(1-2), 5-19. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(88\)90122-0](https://doi.org/10.1016/0168-1591(88)90122-0).
25. Broom, D.M. (2007). Quality of life means welfare: how is it related to other concepts and assessed? *Animal Welfare*, *16*(S1), 45-53. <https://doi.org/10.1017/S0962728600031729>.
26. Bruijnis, M.R.N., Meijboom, F.L.B. y Stassen, E.N. (2013). Longevity as an animal welfare issue applied to the case of foot disorders in dairy cattle. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, *26*, 191-205. <https://doi.org/10.1007/s10806-012-9376-0>.
27. Calle, E.W., García, M.L., Blasco, A. y Argente, M.J. (2017). Correlated response in early embryonic development in rabbits selected for litter size variability. *World Rabbit Science*, *25*(4), 323-327. <https://doi.org/10.4995/wrs.2017.6340>.
28. Canario, L., Lundgren, H., Haandlykken, M. y Rydhmer, L. (2010). Genetics of growth in piglets and the association with homogeneity of body weight within litters. *Journal of Animal Science*, *88*(4), 1240-1247. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2056>.
29. Castellini, C. (2007). Reproductive activity and welfare of rabbit does. *Italian Journal of Animal Science*, *6*(sup1), 743-747. <http://doi.org/10.4081/ijas.2007.1s.743>.
30. Castellini, C., Dal Bosco, A., Arias-Álvarez, M., Lorenzo, P.L., Cardinali, R. y Rebollar, P.G. (2010). The main factors affecting the reproductive performance of rabbit does: A review. *Animal Reproduction Science*, *122*(3-4), 174-182. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.10.003>.
31. Casto-Rebollo, C., Argente, M.J., García, M.L., Pena, R.N., Blasco, A. e Ibáñez-Escriche, N. (2023). Selection for environmental variance shifted the gut

- microbiome composition driving animal resilience. *Microbiome*, 11(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01580-4>.
32. Colditz, I. y Hine, B. (2016). Resilience in farm animals: biology, management, breeding and implications for animal welfare. *Animal Production Science*, 56(12), 1961-1983. <http://dx.doi.org/10.1071/AN15297>.
 33. Cruz-Bacab, L.E., Ramírez-Vera, S., Vázquez-García, M.D.C. y Zapata-Campos, C.C. (2018). Reproducción de conejos bajo condiciones tropicales, efectos negativos y posibles soluciones. *CienciaUAT*, 13(1), 135-145. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i1.989>.
 34. Curtis, S. (2007). Performance indicates animal state of being: A Cinderella axiom? *The Professional Animal Scientist*, 23(6), 573-583. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)31027-5](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)31027-5).
 35. Daader, A.H., Yousef, M.K., Abdel-Samee, A.M. y Abd El-Nou, S.A. (2016). Recent trends in rabbit does reproductive management: special reference to hot regions. (Invited paper). En: Proceedings of the 11th World Rabbit Congress, 15-18 June. Qingdao, China, 149-166.
 36. Dal-Zotto, S., Martí, O., Delgado, R., y Armario, A. (2004). Potentiation of glucocorticoid release does not modify the long-term effects of a single exposure to immobilization stress. *Psychopharmacology*, 177, 230-237. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1939-y>.
 37. De Lima, V., Piles, M., Rafel, O., López-Béjar, M., Ramón, J., Velarde, A. y Dalmau, A. (2013). Use of infrared thermography to assess the influence of high environmental temperature on rabbits. *Research in Veterinary Science*, 95(2), 802-810. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.012>.
 38. Dhabhar, F.S. (2000). Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity: the role of stress hormones and leukocyte trafficking. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917(1), 876-893. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05454.x>.
 39. Dobson, H., Tebble, J.E., Smith, R.F. y Ward, W.R. (2001). Is stress really all that important? *Theriogenology*, 55(1), 65-73. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00446-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00446-5).
 40. Doeschl-Wilson, A.B., Villanueva, B. y Kyriazakis, I. (2012). The first step toward genetic selection for host tolerance to infectious pathogens: obtaining the tolerance phenotype through group estimates. *Frontiers in Genetics*, 3, 265. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00265>.
 41. El Nagar, A., Sánchez, J. P., Ragab, M., Mínguez, C., y Baselga, M. (2020). Genetic variability of functional longevity in five rabbit lines. *animal*, 14(6), 1111-1119. <http://doi.org/10.1017/S1751731119003434>.

42. El Nagar, A.G., Baselga, M., Mínguez, C., Santacreu, M.A. y Sánchez, J.P. (2021). Functional longevity in five rabbit lines founded on different criteria: Comparison at foundation and at fixed times after selection. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 138(4), 508-517. <https://doi.org/10.1111/jbg.12543>.
43. Elgersma, G.G., de Jong, G., van der Linde, R. y Mulder, H.A. (2018). Fluctuations in milk yield are heritable and can be used as a resilience indicator to breed healthy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(2), 1240-1250. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13270>.
44. Etim, N., Offiong, E., Eyoh, G.D. y Udo, M. (2014). Stress and animal welfare: An uneasy relationship. *European Journal of Research in Medical Sciences*, 2(1), 8-15.
45. Ezzat, S., Elwerdany, I.E., Galal, A.E., y Madkour, M. (2019). Effect of early age heat stress on growth performance and some blood parameters of two strains of rabbits. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, 27(5), 2621-2629. <https://doi.org/10.21608/AJS.2019.18072.1101>.
46. Fadl, A.M. (2020). Effect of seasonality on quality and fertility of cryopreserved New Zealand white rabbit semen under Egyptian conditions. *World Rabbit Science*, 28(3), 123-128. <http://hdl.handle.net/10251/151178>.
47. Fernández-Novo, A., Pérez-Garnelo, S.S., Villagra, A., Pérez-Villalobos, N. y Astiz, S. (2020). The Effect of Stress on Reproduction and Reproductive Technologies in Beef Cattle-A Review. *Animals*, 10(11), 2096. <https://doi.org/10.3390/ani10112096>.
48. Ferrian, S., Guerrero, I., Blas, E., García-Diego, F.J., Viana, D., Pascual, J.J. y Corpa, J.M. (2012). How selection for reproduction or foundation for longevity could have affected blood lymphocyte populations of rabbit does under conventional and heat stress conditions. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 150(1-2), 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.08.007>.
49. Ferrian S., Blas E., Larsen T., Sánchez J.P., Friggens N.C., Corpa J.M., Baselga M. y Pascual J.J. (2013). Comparison of immune response to lipopolysaccharide of rabbit does selected for litter size at weaning or founded for reproductive longevity. *Research in Veterinary Science*, 94, 518-525. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.01.008>.
50. Feugier, A. y Fortun-Lamothe, L. (2006). Extensive reproductive rhythm and early weaning improve body condition and fertility of rabbit does. *Animal Research*, 55(5), 459-470. <http://dx.doi.org/10.1051/animres:2006025>.
51. Formoso-Rafferty, N., Cervantes, I., Ibáñez-Escriche, N. y Gutiérrez, J.P. (2016). Correlated genetic trends for production and welfare traits in a mouse population divergently selected for birth weight environmental variability. *Animal*, 10(11), 1770-1777. <https://doi.org/10.1017/S1751731116000860>.

52. Fortun-Lamothe, L. (2006). Energy balance and reproductive performance in rabbit does. *Animal Reproduction Science*, 93(1-2), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.009>.
53. Friggens, N.C., Blanc, F., Berry, D.P. y Puillet, L. (2017). Deciphering animal robustness. A synthesis to facilitate its use in livestock breeding and management. *Animal*, 11(12), 2237-2251. <https://doi.org/10.1017/S175173111700088X>.
54. García, M.L., Blasco, A. y Argente, M.J. (2016). Embryologic changes in rabbit lines selected for litter size variability. *Theriogenology*, 86(5), 1247-1250. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.065>.
55. García, M.L., y Argente, M.J. (2017). Exposure to high ambient temperatures alters embryology in rabbits. *International Journal of Biometeorology*, 61(9), 1555-1560. <https://doi.org/10.1007/s00484-017-1334-0>.
56. García, M.L., Blasco, A., García, M.E. y Argente, M.J. (2019). Correlated response in body condition and energy mobilisation in rabbits selected for litter size variability. *Animal*, 13(4), 784-789. <https://doi.org/10.1017/S1751731118002203>.
57. García, M.L., Muelas, R., Argente, M.J. y Peiró, R. (2021a). Relationship between prenatal characteristics and body condition and endocrine profile in rabbits. *Animals*, 11(1), 95. <https://doi.org/10.3390/ani11010095>.
58. García, M.L., Gunia, M. y Argente, M.J. (2021b). Genetic factors of functional traits. *World Rabbit Science*, 29: 207-220. <https://doi.org/10.4995/wrs.2021.13320>.
59. García-Quirós, A., Arnau-Bonachera, A., Penadés, M., Cervera, C., Martínez-Paredes, E., Ródenas, L., Selva, L., Viana, D., Corpa, J.M. y Pascual, J.J. (2014). A robust rabbit line increases leukocytes counts at weaning and reduces mortality by digestive disorder during fattening. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 161:123-131. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.07.005>.
60. García-Tomás, M., Tusell, L., López-Béjar, M., Ramon, J., Rafel, O. y Piles, M. (2008). Influence of environmental temperature and relative humidity on quantitative and qualitative semen traits of rabbits. En: Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, 10-13 June. Verona, Italy, 359-364.
61. Garreau, H., Bolet, G., Larzul, C., Robert-Granie, C., Saleil, G., SanCristobal, M. y Bodin, L. (2008). Results of four generations of a canalising selection for rabbit birth weight. *Livestock Science*, 119(1-3), 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.02.009>.
62. Garreau, H., Brard, S., Hurtaud, J., Guitton, E., Cauquil, L., Licois, D., Schwartz, B., Combes, S. y Gidenne, T. (2012). Divergent selection for digestive disorders in two commercial rabbit lines: response of crossbred young rabbits to an experimental inoculation of *Echerichia coli* 0-103. En: Proceedings of the 10th

- World Rabbit Congress, 3-6 September. Sharm El-Sheikh, Egypt, Vol. 1, 153-157.
63. Garreau, H., Larzul, C., Tudela, F., Ruesche, J., Ducrocq, V. y Fortun-Lamothe, L. (2017). Energy balance and body reserves in rabbit females selected for longevity. *World Rabbit Science*, 25: 205-213. <https://doi.org/10.4995/wrs.2017.5216>.
64. Gorssen, W., Winters, C., Meyermans, R., Chapard, L., Hooyberghs, K., Janssens, S., Huisman, A., Peeters, K., Mulder, H. y Buys, N. (2023). A promising resilience parameter for breeding: the use of weight and feed trajectories in growing pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14(1), 101. <https://doi.org/10.1186/s40104-023-00901-9>.
65. Gunia, M., Lantier, F., Balmisse, E., Guitton, E., Helloin, E., Le Cren, D., Lenoir, G., Maupin, M., Robert, R., Riou, M. y Garreau, H. (2019). Projet RELAPA (génomique pour la RESistance génétique des LAPins à la PAsteurellose): statut hématologique de lapins résistants et sensible. 18èmes Journées de la Recherche Cunicole, 27-28 mai. Nantes, France, 73-76.
66. Gutiérrez, J.P., Castilla, N.F.R., Sánchez, F., Calvente, F., Guillemin, A., Vasile, M., Márquez, A., Muñoz, M., García-Casco, J.M. y Navarro, I.C. (2022). Selección para robustez y bienestar en cerdo Ibérico utilizando la homogeneidad del peso al nacimiento como criterio de selección. *Suis*, 192, 10-14.
67. Harris, R.B. (2015). Chronic and acute effects of stress on energy balance: are there appropriate animal models? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 308(4), R250-R265. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00361.2014>.
68. Heiming, R.S., Jansen, F., Lewejohann, L., Kaiser, S., Schmitt, A., Lesch, K.P. y Sachser, N. (2009). Living in a dangerous world: the shaping of behavioral profile by early environment and 5-HTT genotype. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 3, 817. <https://doi.org/10.3389/neuro.08.026.2009>.
69. Herrero-Medrano, J.M., Mathur, P.K., Napel, J.T., Rashidi, H., Alexandri, P., Knol, E.F. y Mulder, H.A. (2015). Estimation of genetic parameters and breeding values across challenged environments to select for robust pigs. *Journal of Animal Science*, 93(4), 1494-1502. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8583>.
70. Heuß, E.M., Pröll-Cornelissen, M.J., Neuhoff, C., Tholen, E. y Große-Brinkhaus, C. (2019). Invited review: Piglet survival: benefits of the immunocompetence. *Animal*, 13(10), 2114-2124. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000430>.
71. Hill, W. y Mulder, H. (2010). Genetic analysis of environmental variation. *Genetics Research* 92(5-6), 381-395. <https://doi.org/10.1017/S0016672310000546>.

72. Huang, D., Cai, J., Zhang, C., Jin, R., Bai, S., Yao, F., Ding, H., Zhao, B., Chen, Y., Wu, X. y Zhao, H. (2023). Semen quality and seminal plasma metabolites in male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) under heat stress. *PeerJ* 11:e15112. <https://doi.org/10.7717/peerj.15112>.
73. Jaén-Téllez, J.A., Sánchez-Guerrero, M.J., López-Campos, J.I., Valera, M. y González-Redondo, P. (2020). Acute stress assessment using infrared thermography in fattening rabbits reacting to handling under winter and summer conditions. *Spanish journal of agricultural research*, 18(2), e0502-e0502. <https://doi.org/10.5424/sjar/2020182-15706>.
74. Jaén-Téllez, J.A., Sánchez-Guerrero, M.J., Valera, M. y González-Redondo, P. (2021). Influence of Stress Assessed through Infrared Thermography and Environmental Parameters on the Performance of Fattening Rabbits. *Animals*, 11(6):1747. <https://doi.org/10.3390/ani11061747>.
75. Kanis, E., van den Belt, H., Groen, A.F., Schakel, J. y de Greef, K.H. (2004). Breeding for improved welfare in pigs: a conceptual framework and its use in practice. *Animal Science*, 78(2), 315-329. <https://edepot.wur.nl/164819>.
76. Knap, P.W. (2005). Breeding robust pigs. *Australian journal of experimental agriculture*, 45(8), 763-773. <https://doi.org/10.1071/EA05041>.
77. Knap, P.W., y Doeschl-Wilson, A. (2020). Why breed disease-resilient livestock, and how? *Genetics Selection Evolution*, 52, 1-18. <https://10.1186/s12711-020-00580-4>.
78. Koolhaas, J.M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S.F., Flugge, G., Korte, S.M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., Van Dijk, G., Wöhr, M. y Fuchs, E. (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(5), 1291-1301. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003>.
79. Larzul, C., Ducrocq, V., Tudela, F., Juin, H. y Garreau, H. (2014). The length of productive life can be modified through selection: an experimental demonstration in the rabbit. *Journal of Animal Science*, 92(6): 2395-2401. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7216>.
80. Lusk, J.L. y Norwood, F.B. Animal welfare economics. (2011). *Applied Economic Perspectives and Policy*, 33(4), 463-483. <https://doi.org/10.1093/aep/ppr036>.
81. Madkour, M., Aboelenin, M.M., Shakweer, W.M., Alfarraj, S., Alharbi, S.A., Abdel-Fattah, S.A. y Alagawany, M. (2021). Early life thermal stress modulates hepatic expression of thermotolerance related genes and physiological responses in two rabbit breeds. *Italian Journal of Animal Science*, 20(1), 736-748. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.1914207>.

82. Maertens, L. y Van Herck, A. (2000). Performance of weaned rabbits raised in pens or in classical cages: first results. *World Rabbit Science*, 8(Suppl 1), 435-440.
83. Maertens, L., Lebas, F. y Szendrő, Z. (2006). Rabbit milk: A review of quantity, quality and non-dietary affecting factors. *World Rabbit Science*, 14(4). <https://doi.org/10.4995/wrs.2006.565>.
84. Maes, D.G.D., Duchateau, L., Larriestra, A., Deen, J., Morrison, R.B. y de Kruif, A. (2004). Risk factors for mortality in grow-finishing pigs in Belgium. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 51(7), 321-326. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00780.x>.
85. Mahrose, K.M., Abd El-Monem, U. y Peris, S. (2010). Effects of photoperiod and mating or semen collection times on the performance of does and bucks of New Zealand White rabbits under hot climatic conditions of Egypt. En: 6th International Conference on Rabbit Production in Hot Climates, 1-4 February. Assuit, Egypt.
86. Manteca, X., Mainau, E. y Temple, D. (2013). Estrés en animales de granja: Concepto y efectos sobre la producción. Ficha técnica sobre bienestar de animales de granja. Farm Animal Welfare Education Centre, 6. www.fawec.org.
87. Marai, I.F.M., Ayyat, M.S. y Abd El-Monem, U.M. (2001). Growth performance and reproductive traits at first parity of New Zealand White female rabbits as affected by heat stress and its alleviation under Egyptian conditions. *Tropical Animal Health and Production*, 33, 451-462. <https://doi.org/10.1023/A:1012772311177>.
88. Marai, I.F.M., Habeeb, A.A.M. y Gad, A.E. (2002). Rabbits' productive, reproductive and physiological performance traits as affected by heat stress: a review. *Livestock Production Science*, 78(2), 71-90. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00091-X](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00091-X).
89. Marai, I.F.M., Habeeb, A.M. y Gad, A. (2004). Reproductive traits of female rabbits as affected by heat stress and lighting regime under subtropical conditions of Egypt. *Animal Science*, 78(1), 119-127. <https://doi.org/10.1017/S135772980005390X>.
90. Marai, I.F.M., Haebe, A.A.M. y Gad, A.E. (2007). Biological functions in young pregnant rabbit does as affected by heat stress and lighting regime under subtropical conditions of Egypt. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 7(3), 165-176. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93970303>.
91. Marco-Jiménez, F., García-Diego, F.J. y Vicente-Antón, J.S. (2017). Effect of gestational and lactational exposure to heat stress on performance in rabbits. *World Rabbit Science*, 25(1), 17-25. <http://hdl.handle.net/10251/79357>.
92. Matics, Z., Gerencsér, Z., Radnai, I., Dalle Zotte, A., Palumbo, M., Mikó, A., Kasza, R. y Szendrő, Z. (2013). Effect of different lighting schedules (16L: 8D or

- 12L: 6D) on reproductive performance and nursing behaviour of rabbit does. *Livestock Science*, 157(2-3), 545-551. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.09.006>.
93. Matics, Z., Cullere, M., Dalle Zotte, A., Szendrő, K., Szendrő, Z., Odermatt, M., Atkári, T., Radnai, I., Nagu, I. y Gerencsér, Z. (2018). Effect of cage and pen housing on the live performance, carcass, and meat quality traits of growing rabbits. *Italian Journal of Animal Science*, 18:1, 441-449. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1532329>.
94. Miranda-de la Lama, G.C., Bermejo-Poza, R., Formoso-Rafferty, N., Mitchell, M., Barreiro, P. y Villarroel, M. (2021). Long-distance Transport of finisher pigs in the Iberian Peninsula: Effects of season on thermal and enthalpy conditions, welfare indicators and meat pH. *Animals*, 11(8), 2410. <https://doi.org/10.3390/ani11082410>.
95. Mormède, P., Foury, A., Terenina, E. y Knap, P.W. (2011). Breeding for robustness: the role of cortisol. *Animal*, 5(5), 651-657. <https://doi.org/10.1017/S1751731110002168>.
96. Most, M.S., & Yates, D.T. (2021). Inflammatory mediation of heat stress-induced growth deficits in livestock and its potential role as a target for nutritional interventions: A review. *Animals*, 11(12), 3539. <https://doi.org/10.3390/ani11123539>.
97. Mulder, H.A. y Rashidi, H. (2017). Selection on resilience improves disease resistance and tolerance to infections. *Journal of Animal Science*, 95(8), 3346-3358. <https://doi.org/10.2527/jas.2017.1479>.
98. Oladimeji, A.M., Johnson, T.G., Metwally, K., Farghly, M. y Mahrose, K.M. (2022). Environmental heat stress in rabbits: implications and ameliorations. *International Journal of Biometeorology*, 66(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s00484-021-02191-0>.
99. Pascual, J.J., Cervera, C., Blas, E. y Fernández-Carmona, J. (1996). Milk yield and composition in rabbit does using high fat diets. En: Proceedings of the 6th World Rabbit Congress. Toulouse, France. Vol. 1, pp. 259-261.
100. Pascual, J. J., Castella, F., Cervera, C., Blas, E. y Fernández-Carmona, J. (2000a). The use of ultrasound measurement of perirenal fat thickness to estimate changes in body condition of young female rabbits. *Animal Science*, 70(3), 435-442. <https://doi.org/10.1017/S135772980005178X>.
101. Pascual, J.J., Fonfria, M.J., Alqedra, I., Cervera, C. y Fernández-Carmona, J. (2000b). Use of lucerne-based diets on reproductive rabbit does. En: Proceedings of the 7th World Rabbit Congress. Valencia, Spain. Vol. 100, pp. 379-384.

102. Pascual Amorós, J.J., Blanco, J., Piquer, O., Quevedo, F. y Cervera, C. (2004). Ultrasound measurements of perirenal fat thickness to estimate the body condition of reproducing rabbit does in different physiological states. *World Rabbit Science*, 12(1), 7-21. <https://doi.org/10.4995/wrs.2004.584>.
103. Peiró, R., Badawy, A. Y., Blasco, A. y Santacreu, M.A. (2019). Correlated responses on growth traits after two-stage selection for ovulation rate and litter size in rabbits. *Animal*, 13(11), 2457-2462. <https://doi.org/10.1017/S1751731119001423>.
104. Peiró, R., Quirino, C., Blasco, A. y Santacreu, M.A. (2021). Correlated Response on Growth Traits and Their Variabilities to Selection for Ovulation Rate in Rabbits Using Genetic Trends and a Cryopreserved Control Population. *Animals*, 11(9), 2591. <https://doi.org/10.3390/ani11092591>.
105. Peixoto-Gonçalves, C., Martínez-Paredes, E., Ródenas, L., Corpa, J.M., Blas, E., Cambra-López, M. y Pascual, J.J. (2023). Growth performance of three paternal rabbit lines with different potential for growth rate and resilience. *World Rabbit Science*, 31(4), 221-228. <https://doi.org/10.4995/wrs.2023.19841>.
106. Piles, M., García, M. L., Rafel, O., Ramon, J., & Baselga, M. (2006). Genetics of litter size in three maternal lines of rabbits: Repeatability versus multiple-trait models. *Journal of Animal Science*, 84(9), 2309-2315. <https://doi.org/10.2527/jas.2005-622>.
107. Piles, M., Santacreu, M. A., Blasco, A., & Sanchez, J. P. (2021). Genetics of reproduction in the rabbit. In *The genetics and genomics of the rabbit* (pp. 212-233). Wallingford UK: CABI. <https://doi.org/10.1079/9781780643342.0012>.
108. Poppe, M., Veerkamp, R.F., Van Pelt, M.L. y Mulder, H.A. (2020). Exploration of variance, autocorrelation, and skewness of deviations from lactation curves as resilience indicators for breeding. *Journal of Dairy Science*, 103(2), 1667-1684. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17290>.
109. Poppe, M., Bonekamp, G., van Pelt, M.L. y Mulder, H.A. (2021). Genetic analysis of resilience indicators based on milk yield records in different lactations and at different lactation stages. *Journal of Dairy Science*, 104(2), 1967-1981. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19245>.
110. Prims, S., Hole, C.V., Van Cruchten, S., Van Ginneken, C., Van Ostade, X. y Casteleyn, C. (2019). Hair or salivary cortisol analysis to identify chronic stress in piglets? *The Veterinary Journal*, 252, 105357. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.105357>.
111. Rafai, P. y Papp, Z. (1984). Temperature requirement of does for optimal performance. *Archiv fur experimentelle Veterinarmedizin*, 38(3), 450-457.
112. Sakr, O.G., Mousa, B.H., Emam, K.R.S., Morsy, A.S. y Ahmed, N.A.E.H. (2019). Effect of early heat shock exposure on physiological responses and

- reproduction of rabbits under hot desert conditions. *World's Veterinary Journal*, 9(2), 90-101. <https://dx.doi.org/10.36380/scil.2019.wvj13>.
113. Sánchez J.P., Theilgaard P., Mínguez C. y Baselga M. (2008). Constitution and evolution of a long-lived productive rabbit line. *Journal of Animal Science*, 86: 515-525. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0217>.
 114. Sánchez, J.P., de La Fuente, L.F. y Rosell, J.M. (2012). Health and body condition of lactating females on rabbit farms. *Journal of Animal Science*, 90(7), 2353-2361. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4065>.
 115. Sánchez-Molano, E., Kapsona, V.V., Oikonomou, S., McLaren, A., Lambe, N., Conington, J. y Banos, G. (2020). Breeding strategies for animal resilience to weather variation in meat sheep. *BMC genetics*, 21, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12863-020-00924-5>.
 116. SanCristobal-Gaudy, M., Elsen, J.M., Bodin, L. y Chevalet, C. (1998). Prediction of the response to a selection for canalisation of a continuous trait in animal breeding. *Genetics Selection Evolution*, 30(5), 423-451. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-30-5-423>.
 117. Savietto, D., Cervera, C., Blas, E., Baselga, M., Larsen, T., Friggens, N.C. y Pascual, J.J. (2013). Environmental sensitivity differs between rabbit lines selected for reproductive intensity and longevity. *Animal*, 7: 1969-1977. <https://doi.org/10.1017/S175173111300178X>.
 118. Savietto, D., Friggens, N. y Pascual, J.J. (2015). Reproductive robustness differs between generalist and specialist maternal rabbit lines: the role of acquisition and allocation of resources. *Genetics Selection Evolution*, 47: 2. <https://doi.org/10.1186/s12711-014-0073-5>.
 119. Savietto, D., Martínez-Paredes, E. y Pascual, J.J. (2019). Influences of environment on the development and lifetime reproductive performance in domestic rabbit females. *World Rabbit Science*, 27(3), 123-133. <https://doi.org/10.4995/wrs.2019.11968>.
 120. Schröder, U.J. y Staufienbiel, R. (2006). Invited review: Methods to determine body fat reserves in the dairy cow with special regard to ultrasonographic measurement of backfat thickness. *Journal of dairy science*, 89(1), 1-14. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72064-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72064-1).
 121. Sell-Kubiak, E., Bijma, P., Knol, E.F. y Mulder, H.A. (2015). Comparison of methods to study uniformity of traits: Application to birth weight in pigs. *Journal of Animal Science*, 93(3), 900-911. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8313>.
 122. Serrano-Jara, D., Baeza, M., Agea, I., Argente, M.J. y García, M.L. (2023). Evaluación del estrés con termografía de infrarrojos tras la extracción espermática

- en conejos. En: 47th Symposium de Cunicultura: Asociación Española de Cunicultura, junio, León, España. 142-146.
123. Serrano-Jara, D., Biada, I., Argente, M.J., Santacreu, M.A. y García, M.L. (2024). Environmental stress response assessment by infrared thermography in two lines divergently selected for litter size variability. En: Proceeding of 13th World Rabbit Congress, Tarragona, Spain. 2-4 Octubre de 2024.
 124. Sevillano, C.A., Mulder, H.A., Rashidi, H., Mathur, P.K. y Knol, E.F. (2016). Genetic variation for farrowing rate in pigs in response to change in photoperiod and ambient temperature. *Journal of Animal Science*, 94(8), 3185-3197. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9915>.
 125. Sobey, W.R. (1969). Selection for resistance to myxomatosis in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Epidemiology and Infection*, 67(4), 743-754. <https://doi.org/10.1017/s0022172400042194>.
 126. Stewart, M., Webster, J.R., Schaefer, A.L., Cook, N.J. y Scott, S.L. (2005). Infrared thermography as a non-invasive tool to study animal welfare. *Animal Welfare*, 14(4), 319-325. <https://doi.org/10.1017/S096272860002964X>.
 127. Szendrő, Z., Papp, Z., Kustos, K. Effect of environmental temperature and restricted feeding on production of rabbit does. (1999). In: Testik A. (ed.), Basella M. (ed.). 2. International Conference on Rabbit Production in Hot Climates. Zaragoza: CIHEAM, 1999. p. 11-17 (Cahiers Options Méditerranéennes; n.41).
 128. Szendrő, Z. y Dalle Zotte, A. (2011). Effect of housing conditions on production and behaviour of growing meat rabbits: A review. *Livestock science*, 137(1-3), 296-303. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.11.012>.
 129. Szendrő, Z., Gerencsér, Z., McNitt, J. y Matics, Z. (2016). Effect of lighting on rabbits and its role in rabbit production: A review. *Livestock Science*, 183, 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.11.012>.
 130. Tabarin, A., Diz-Chaves, Y., Consoli, D., Monsaingeon, M., Bale, T., Culler, M., Datta, R., Drago, F., Vale, W.W., Koob, G.F., Zorrilla, E.P. y Contarino, A. (2007). Role of the corticotropin-releasing factor receptor type 2 in the control of food intake in mice: a meal pattern analysis. *European Journal of Neuroscience*, 26(8), 2303-2314. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05856.x>.
 131. Taghipoor, M., Pastell, M., Martin, O., Ba, H.N., Van Milgen, J., Doeschl-Wilson, A., Loncke, C., Friggens, N.C., Puillet, L. y Muñoz-Tamayo, R. (2023). Animal board invited review: Quantification of resilience in farm animals. *animal*, 17(9), 100925. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100925>.
 132. Tatemoto, P., Bernardino, T., Rodrigues, F.A.M.L. y Zanella, A.J. (2019). Does high stereotypic behavior expression affect productivity measures in sows? *Revista Brasileira de Zootecnia*, 48. <https://doi.org/10.1590/rbz4820180135>.

133. Theilgaard, P., Sánchez, J.P., Pascual, J.J., Friggens, N. C. y Baselga, M. (2006). Effect of body fatness and selection for prolificacy on survival of rabbit does assessed using a cryopreserved control population. *Livestock Science*, 103(1-2), 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.01.007>.
134. Theilgaard, P., Sanchez, J.P., Pascual, J.J., Berg, P., Friggens, N.C. y Baselga, M. (2007). Late reproductive senescence in a rabbit line hyper selected for reproductive longevity, and its association with body reserves. *Genetics Selection Evolution*, 39: 207-223. <https://doi.org/10.1051/gse:2006043>.
135. Theilgaard P., Baselga M., Blas, M., Friggens N.C., Cervera C. y Pascual J.J. (2009). Differences in productive robustness in rabbits selected for reproductive longevity or litter size. *Animal*, 3: 637-646. <https://doi.org/10.1017/S1751731109003838>.
136. Trevisi, E. y Bertoni, G. (2009). Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*, 8(sup1), 265-286. <https://doi.org/10.4081/ijas.2009.s1.265>.
137. Turner, T. T. y Lysiak, J. J. (2008). Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *Journal of andrology*, 29(5), 488-498. <https://doi.org/10.2164/jandrol.108.005132>.
138. Unruh, E.M., Theurer, M.E., White, B.J., Larson, R.L., Drouillard, J.S. y Schrag, N. (2017). Evaluation of infrared thermography as a diagnostic tool to predict heat stress events in feedlot cattle. *American journal of veterinary research*, 78(7), 771-777. <https://doi.org/10.2460/ajvr.78.7.771>.
139. Valera, M., Bartolomé, E., Sánchez, M.J., Molina, A., Cook, N. y Schaefer, A.L. (2012). Changes in eye temperature and stress assessment in horses during show jumping competitions. *Journal of equine veterinary science*, 32(12), 827-830. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.03.005>.
140. Van Staaveren, N., Doyle, B., Manzanilla, E.G., Calderón Díaz, J.A., Hanlon, A. y Boyle, L.A. (2017). Validation of carcass lesions as indicators for on-farm health and welfare of pigs. *Journal of Animal Science*, 95(4), 1528-1536. <https://doi.org/10.2527/jas.2016.1180>.
141. Verbeke, W.A. y Viaene, J. (2000). Ethical challenges for livestock production: Meeting consumer concerns about meat safety and animal welfare. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 12, 141-151. <https://doi.org/10.1023/A:1009538613588>.
142. Vianna, D.M. y Carrive, P. (2005). Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 21(9), 2505-2512. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04073.x>.

143. Villalba-Caloca, J., Arreola-Ramírez, J.L., Alquicira-Mireles, J., Vargas, M.H., Carbajal-Salinas, V. y Segura-Medina, P. (2020). Respiratory changes during adaptation to stress induced by movement restriction in rabbits. *Research Square*, preprint (version 1). <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-16582/v1>.
144. Walker, P. y Carrive, P. (2003). Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery. *Neuroscience*, 116(3), 897-912. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00744-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00744-3).
145. Williams, J. y Randle, H. (2017). Is the expression of stereotypic behavior a performance-limiting factor in animals? *Journal of Veterinary Behavior*, 20, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2017.02.006>.
146. Yazdi, M.H., Rydhmer, L., Ringmar-Cederberg, E., Lundeheim, N. y Johansson, K. (2000). Genetic study of longevity in Swedish Landrace sows. *Livestock Production Science*, 63(3), 255-264. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(99\)00133-5](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(99)00133-5).
147. Yu, Z. M., Wang, M., Chen, K., Xiao, L.Y., Deng, X.T. y Gong, T. (2017). Chronic stress model in New Zealand white rabbit with hyperlipidemia. *Zhonghua yi xue za zhi*, 97(7), 529-534. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2017.07.012>.
148. Yu, Z.-M., Deng, X.T., Qi, R.M., Xiao, L.Y., Yang, C.Q. y Gong, T. (2018). Mechanism of chronic stress-induced reduced atherosclerotic medial area and increased plaque instability in rabbit models of chronic stress. *Chinese Medical Journal*, 131(02), 161-170. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.222322>.
149. Yuan, H., Liu, C.L., Wang, H.Y., Wang, L.J. y Sun, F. (2022). Optimization and comparison of models for core temperature prediction of mother rabbits using infrared thermography. *Infrared Physics & Technology*, 120, Article 103987. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2021.103987>.