

4.1.- EXPERIMENTO 1

Los resultados obtenidos en el análisis de la fertilidad y prolificidad in vivo muestran un aumento significativo del número de gazapos nacidos vivos ($P < 0.0001$) mediante la suplementación con propilenglicol (Tabla 1). En cambio, no se han detectado diferencias significativas en cuanto a la fertilidad.

Tabla 1: Resultados de fertilidad y prolificidad en función de la suplementación.

	Tratamiento	Control	P-valor
Fertilidad	$89\% \pm 5.6$	$85\% \pm 6.4$	NS
Prolificidad	10.05 ± 1.32	9.15 ± 1.37	< 0.0001

4.1.1.- Prolificidad

Las medias obtenidas en el número de gazapos vivos fueron de 10.05 ± 1.32 y 9.15 ± 1.37 en los grupos con suplemento y control, respectivamente.

Los resultados obtenidos a partir del GLM realizado con el SAS mostraron un $P < 0.0001$ al comparar las medias de prolificidad entre grupos de animales con tratamiento respecto a control.

4.1.2.- Fertilidad

Los resultados de fertilidad han sido de 85 y 89% en los grupos tratamiento y control, respectivamente. No han mostrado diferencias significativas.

4.2.- EXPERIMENTO 2

Los resultados del Experimento 1 llevan a estudiar el porqué de unas diferencias estadísticamente significativas y relevantes para la productividad anual. Por lo tanto, para determinar qué etapa de la fisiología del desarrollo folicular y/o embrionario es la que se traduce, ante la aportación de propilenglicol, en un aumento de la prolificidad, se procede a estudiar diversos puntos en los cuales podría ejercer su efecto. Això és discussió

Cada determinación de este experimento se ha realizado por un método distinto, debido a las distintas distribuciones de los datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 2: Variables analizadas en hembras tratadas con propilenglicol y control a las 48-72 horas postcoito.

	Tratamiento	Control	P-valor
Tasa de ovulación	12'26±0'55	12'17±0'61	NS
Nº embriones	10'58±0'48	10'43±0'64	NS
Tasa de recuperación	0'89±0'068	0'87±0'075	NS
Nº oocitos por sesión	17'8±9'35	24'7±8'49	NS
Espesor capa mucina	49'8±11'25	50'7±9'33	NS
Diámetro del embrión	110'5±15'27	108'3±18'32	NS

4.2.1.- Tasa de ovulación, número de embriones y tasa de recuperación

Los resultados para la tasa de ovulación no presentaron diferencias respecto a la suplementación con propilenglicol.

Por otra parte, el número y la calidad, así como la localización (oviducto y útero) de embriones obtenidos por hembra y la tasa de recuperación embrionaria, obtenida a partir del número de embriones respecto a la tasa de ovulación, tampoco presentaron diferencias significativas respecto al tratamiento.

4.2.2.- Número de oocitos obtenidos por punción ovárica

En la punción ovárica donde se obtienen oocitos por aspiración de folículos antrales, el número y la calidad de oocitos obtenidos de animales con tratamiento respecto a control no ha mostrado diferencias significativas.

4.2.3.- Calidad y desarrollo embrionario

La calidad y desarrollo embrionario preimplantacional in vivo, determinados a partir del estadio de desarrollo embrionario, diámetro del embrión y espesor de la capa de mucina no han mostrado diferencias significativas entre grupos.

4.3.- EXPERIMENTO 3

El último proceso estudiado en este trabajo es el desarrollo embrionario preimplantacional durante 120 horas de cultivo in vitro.

4.3.1.- Resultados

Los resultados obtenidos en las medidas de los embriones mostraron una significación técnica y estadística para las tres variables sólo en el caso de la medida del diámetro del embrión. Los estimadores no significativos son 0, es decir no generan un modelo estadístico. El coeficiente para la variable tiempo de cultivo mostró un efecto técnico y estadísticamente significativo en todas las medidas, por lo que a continuación se explica qué se obtiene de los efectos de las dos variables cualitativas restantes, el tratamiento y el ambiente de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3: Valores de los estimadores y de su significancia en el modelo.

Variables	Modelo cronología		Modelo mucina		Modelo diámetro total		Modelo embrión	
	Estimador	P-valor	Estimador	P-valor	Estimador	P-valor	Estimador	P-valor
Tratamiento	-	NS	-	NS	2'8676	0'0904	1'280	0'0117
Ambiente	-	NS	-	NS	-	NS	0'793	0'0177
Horas	8'5231	<0'0001	3'8347	<0'0001	16'6995	<0'0001	0'973	<0'0001

a) Cronología del desarrollo embrionario

No se obtuvieron diferencias en los resultados cuando se comparó la cronología del desarrollo entre grupos. Los porcentajes de embriones que llegaron a blastocistos fueron muy similares en todos los grupos y sólo se observó un efecto técnico y estadísticamente significativo en el estimador de la variable horas de cultivo.

b) Espesor de la capa de mucina

No se observa ningún efecto significativo de los coeficientes de la variable tratamiento y ambiente de cultivo para el espesor de la capa de mucina.

c) Diámetro total del embrión

Se observó una tendencia estadística ($P < 0'1$) para el coeficiente del tratamiento cuando se analizaba la medida del diámetro total del embrión. Según la codificación de los efectos y teniendo en cuenta los estimadores, el modelo expresa un mayor diámetro medio cuando los embriones proceden de hembras suplementadas con propilenglicol respecto al grupo control, tanto en ambiente confort como sometidas a estrés térmico. En cambio, no se observa efecto estadístico del ambiente de cultivo sobre el tamaño total del embrión cuando la variable tratamiento está presente en el modelo.

d) Diámetro interno del embrión

La explicación al fenómeno anterior se deduce cuando observamos el efecto de los coeficientes de las variables cualitativas sobre el diámetro interno del embrión (sin tener en cuenta la capa de mucina). Se obtuvieron unos niveles de significancia de $0'01 < P < 0'05$ para la variable tratamiento y para la variable cultivo sobre el efecto producido en la variable del diámetro interno del embrión. En este caso los resultados mostraron un efecto estadísticamente significativo para los coeficientes tanto del tratamiento como del ambiente, siendo dos veces mayor el efecto del primero respecto al segundo.

4.4.- DISCUSIÓN GENERAL

4.4.1.- Experimento 1

En el estudio realizado por Fortun-Lamothe (2008) se observó que un incremento del nivel energético de la ración antes de la cubrición o de la inseminación artificial aumentaba la fertilidad desde 78'4% hasta 97'1%. En nuestro estudio no se ha observado un incremento significativo de la fertilidad en el grupo de tratamiento, probablemente porque los resultados de fertilidad de los animales control ya presentaban niveles de fertilidad elevados (85%).

Estudios anteriores en los que se ha utilizado el mismo suplemento en diferentes situaciones fisiológicas, como Luzi et al. (2001), demostraron que la aportación de propilenglicol después del parto favorece la recuperación de la condición corporal e incrementa la fertilidad en el siguiente ciclo. En este caso, no se usa el suplemento a modo de flushing como se ha realizado en el presente estudio.

En cuanto a los resultados de prolificidad, significativos en este caso, no concuerdan con los obtenidos por Sakr et al. (2011), donde no observaron diferencias entre grupos. No obstante, hay que tener en cuenta la diferencia existente entre los ensayos; por una parte, en este experimento se utilizaron animales de todas las edades y estados (núlparas, primíparas, múltiparas lactantes y no lactantes), mientras que en el experimento realizado por Sakr et al. (2011) sólo utilizaron hembras primíparas.

Por otra parte, en el presente experimento se busca el efecto flushing que provoca la sobrealimentación en los momentos previos a la ovulación, mientras que Sakr et al. (2011) aplican el propilenglicol de forma continua durante medio ciclo y ciclo completo, lo que en realidad no se puede interpretar como una sobrealimentación, ya que los animales acaban compensando la ingesta de la sustancia con alto valor energético por medio de la reducción del consumo de pienso concentrado, lo que podría enmascarar el efecto del suplemento energético en sí cuando se aporta en una sola toma. Esta explicación concuerda con los resultados publicados por Christensen et al. (1997) sobre vacas lecheras de alta producción respecto a la liberación de insulina y el incremento de la gluconeogénesis. Estos autores observaron que la administración de propilenglicol en una sola dosis tiene mayor efecto beneficioso sobre fertilidad que la administración en la mezcla Unifeed. Otros autores como Ebling y Foster (1991), Fink et al. (1998) y Khireddine et al. (1998), también usaron el flushing nutricional en oveja, cabra y vaca, respectivamente, obteniendo resultados satisfactorios en cuanto a fertilidad.

4.4.2.- Experimento 2

El Experimento 2 se realizó como consecuencia de la determinación de la ley del comportamiento del sistema con la hipótesis que relaciona siempre prolificidad con tasa de ovulación y en consecuencia con número de embriones recuperados.

Hulot y Matheron (1979) relacionaron la tasa de ovulación con prolificidad. En nuestro estudio, se ha observado que la mayor prolificidad no es debida a una mayor tasa de ovulación.

En consecuencia, es coherente relacionar la tasa de ovulación con el número de embriones recuperados, por lo que resulta lógico no haber observado diferencias.

Por otra parte, la tasa de implantación está limitada por un espesor mínimo de la capa de mucina (Murakami e Imai, 1996). En nuestro estudio las medias del espesor de la capa de mucina presentan un promedio de unos 40 μm , el doble del mínimo determinado por los anteriores autores, lo que sugiere que la diferencia de prolificidad no se encuentra en una mayor calidad embrionaria.

Como se habla en la introducción, en muchos casos el número de crías paridas es ligeramente menor que la tasa de ovulación, sólo una pequeña proporción de hembras alcanza el máximo número de crías definido por la tasa de ovulación. Prolificidad es el número de crías observadas al parto, por lo que estos hechos advierten que el efecto del flushing se centra en procesos más indirectos que la tasa de ovulación.

4.4.3.- Experimento 3

Los resultados obtenidos del modelo son que no solamente el efecto del tratamiento aumenta el tamaño medio del embrión comparando dentro de grupos de cultivo, sino que además los embriones procedentes de hembras suplementadas con propilenglicol son por término medio mayores, enmascarando de esta manera el efecto negativo de crecimiento en los del grupo sometidos a estrés térmico.

Hay que hacer constar aunque el modelo obtuvo más del 80% sobre el test de concordancia de los datos, que este modelo explica la distribución de la población presente de datos y no puede ser tomado como una ley de comportamiento del sistema. El modelo de regresión logística múltiple resulta eficiente a la hora de explicar la distribución de la presente población de datos. No obstante, si se pretende extrapolar el efecto habría que subrayar el efecto que se extrae de los resultados obtenidos; el tratamiento con propilenglicol produce por término medio embriones de mayor tamaño.

En este apartado no es posible comparar los resultados obtenidos. Sin embargo, al igual que Murakami e Imai (1996) afirmaron que el espesor de la capa de mucina tenía que presentar un valor mínimo de 20 μm para la correcta implantación, en este caso el aumento de prolificidad podría estar relacionado con el mayor diámetro del embrión, lo cual también podría indicar una mayor actividad metabólica e incluso un mayor número de células de los blastocistos antes de su implantación.

De forma indirecta el propilenglicol puede estar aportando energía a los embriones procedentes de hembras suplementadas experimentando un mayor crecimiento. Este hecho podría estar relacionado con la disminución de pérdidas prenatales en general.

Estas pérdidas se cifran por Hulot y Matheron (1979), Pla (1984) y Molina (1987) entre un 10'5 y un 14'84% en el periodo comprendido entre la implantación y los 12 días postcoito. Entre un 18'3 y un 26'7% desde la implantación hasta el parto (Adams, 1960; Torres, 1986; Santacreu et al., 1990). En las primeras etapas estas pérdidas están directamente relacionadas con deficiencias en el ambiente oviductal o anomalías en el desarrollo de los embriones (Molina et al., 1987).

Sánchez et al. (2012) observaron una relación directa entre nivel de condición corporal y estado sanitario de las hembras. Un mejor nivel de la condición corporal favorece indirectamente la productividad de los animales.

La conclusión al respecto de los resultados obtenidos es que el aumento de la prolificidad puede venir determinado por una diferencia de supervivencia embrionaria en cualquiera de las fases debido principalmente al mejor desarrollo observado de los embriones procedentes de hembras con suplemento energético.