

3.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1.1.- Estudio del efecto del flushing nutricional sobre la productividad in vivo

El experimento 1 se diseñó y realizó en su totalidad en una explotación comercial de producción de carne. Las 510 conejas de producción de distintas edades alojadas en la misma sala se dividieron en dos grupos experimentales totalmente aleatorios. Los grupos que formaron el experimento fueron dos, el grupo control y el grupo con tratamiento mediante la aportación de un suplemento nutritivo. El experimento se realizó durante dos ciclos consecutivos y las hembras que formaron parte de los grupos fueron elegidas totalmente al azar.

El tratamiento al que fueron sometidas se basa en un flushing energético durante las 72 hasta las 48 horas en el agua de bebida antes de la realización de la inseminación. Al grupo control no se le aplica el tratamiento.

Como suplemento nutritivo para realizar el flushing se elige el Propilenglicol, un producto con alto valor energético y de liberación rápida, y fue aplicado de forma individualizada en la cazoleta del agua de bebida. La dosis aplicada fue de 2mL de producto aportado en una sola dosis 48 horas antes de la realización de la inseminación artificial (IA), y 24 horas después de la aplicación de gonadotropina coriónica equina (eCG) para la sincronización del celo.

En este experimento se determinaron los resultados de fertilidad y prolificidad de las hembras que forman los grupos, expresados en porcentaje la fertilidad, y en número de gazapos nacidos vivos (NNV), por parto y hembra, la prolificidad.

3.1.2.- Estudio del efecto fisiológico reproductivo y del desarrollo preimplantacional

El experimento 2 fue desarrollado en la explotación comercial hasta las 48-72 horas posteriores a la inseminación. En este momento las hembras se trasladaban a la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, donde se sacrificaban. Después de ser sacrificadas se procedía a la extracción del aparato reproductor y a la toma de muestras (para análisis posteriores).

In vivo, previamente a la IA se dividían los animales en dos grupos de nuevo, al igual que en el experimento 1, control y tratamiento, en este caso al grupo tratamiento se le suministraban 6mL de suplemento, dividido en dos aportaciones de 3mL, una 60 y la otra 48 horas antes de la IA. Se realizaron 8 sesiones a lo largo de 9 meses, en las cuales se seleccionaban 9-10 conejas en cada sesión.

Se determinó individualmente la tasa de ovulación (TO) y se realizaron lavados de oviducto y útero para obtener los embriones. Se determinó también el número de embriones (Nemb) por animal y la tasa de recuperación embrionaria (TR), que es igual al cociente $Nemb/TO$. Se tuvo en cuenta la calidad embrionaria y el estadio de desarrollo de los embriones, así como su localización en el tracto genital (oviducto o útero). Previamente a la puesta en cultivo se realizaron fotografías a cada uno de los embriones, mediante una cámara incorporada a un microscopio invertido de

contraste de fases (Nikon), y posteriormente se midió el diámetro del embrión y el espesor de la capa de mucina.

En este experimento se pretendía estudiar si el tratamiento con propilenglicol ejerce, en primer lugar un efecto sobre la tasa de ovulación, o bien sobre el número de embriones y la tasa de recuperación embrionaria, y finalmente sobre la calidad de los mismos, morfológica y en tamaño (Adams, 1973).

3.1.3.- Evaluación de la respuesta a factores estresantes de los embriones cultivados in vitro

El experimento 3 fue desarrollado íntegramente en el laboratorio del Grup de Recerca en Biologia de la Reproducció i Embriologia d'Animals Domèstics i Salvatges del Departament d'Anatomia i Sanitat Animals de la Facultat de Veterinària de Barcelona.

Los embriones procedentes de cada hembra, las cuales formaron parte de los grupos del experimento 2, se subdividieron individualmente en dos grupos nuevos. Estos dos nuevos grupos son el grupo confort y el grupo de estrés térmico, los cuales forman la variable ambiente.

Los embriones fueron cultivados durante 120 horas. El grupo confort se incubó a una temperatura homogénea de 38'5°C y una concentración de CO₂ del 5%, mientras al grupo de estrés térmico se le aplicó una temperatura de 42'5°C durante 3 horas al día y la misma concentración de CO₂.

En este experimento de nuevo, se realizaron fotografías, cada día a la misma hora y después de haber sido sometidos al periodo de estrés térmico el grupo en particular.

En este estudio se pretendía determinar si el tratamiento con propilenglicol podría aportar algún componente de resistencia a factores ambientales limitantes para el desarrollo, por tanto, si un presumible factor de resistencia a estrés térmico podría ser presente en los embriones. De esta manera usando las imágenes se determinó la medida de cada embrión, de la capa de mucina y del estado de desarrollo embrionario en función de las horas de cultivo. Como se explica en la introducción, la medida del embrión es relevante para producirse la implantación en los cuernos uterinos de la coneja.

3.2.- ANIMALES Y ALOJAMIENTO

Los animales utilizados en los distintos experimentos fueron conejas de producción (*Oryctolagus cuniculus cuniculus*), concretamente híbridos de líneas comerciales seleccionadas por tamaño de camada. Todos los animales reproductores nacieron en la propia explotación donde se alojaron toda la vida productiva, y procedían del cruzamiento entre “abuelas” de líneas puras de la línea V con “abuelos” de la línea A, las dos líneas seleccionadas por tamaño de camada.

Los embriones utilizados en los experimentos 2 y 3 procedieron de las hembras reproductoras híbridas (A x V) inseminadas con mezclas heterospérmicas de semen procedente de machos de la línea R, línea seleccionada por velocidad de crecimiento.

Los animales empleados para los estudios del efecto fisiológico reproductivo, del desarrollo embrionario preimplantacional y de la respuesta a factores estresantes de los embriones cultivados in vitro fueron escogidos completamente al azar, sobre el total de animales de desecho en cada ciclo. La eutanasia, en su caso, se realizó con una sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal) administrado por vía intravenosa en la vena marginal de la oreja.

3.3.- TÉCNICAS Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

3.3.1.- Determinación de la fertilidad y prolificidad in vivo

El Experimento 1 se centra en el estudio del efecto producido por la aplicación de un suplemento nutritivo a modo de flushing los días previos a la inducción de la ovulación.

La determinación de los resultados, en este caso de fertilidad y prolificidad se realizó en dos fases. En primer lugar, el diagnóstico de gestación fue realizado por palpación abdominal sobre el día 15 post-inseminación y la fertilidad se calculó de acuerdo al número de gestaciones a término con respecto al número de inseminaciones realizadas. En la segunda fase, el cálculo de la prolificidad y la mortinatalidad, es decir, el número de nacidos vivos y muertos por parto, se realizó en el momento del mismo.

3.3.2.- Análisis macroscópico y microscópico del efecto fisiológico reproductivo

Este estudio que corresponde al Experimento 2 se realiza íntegramente después de ser sacrificados los animales. El aparato reproductor se extrae de la cavidad abdominal para facilitar las tareas de recuento de cuerpos lúteo y lavado de oviductos.

3.3.2.a.- Estudio macroscópico del ovario

Los ovarios, junto todo el aparato reproductor, se obtuvieron después de sacrificar las hembras y practicar una necropsia abdominal.

a) Determinación de la tasa de ovulación

La tasa de ovulación se determinó mediante el recuento del número de cuerpos lúteo presentes en cada ovario. Para evitar en la medida de lo posible los errores de recuento debidos a la proximidad entre ciertos cuerpos lúteo se empleó una lupa monocular que permite trabajar reduciendo el error de conteo.

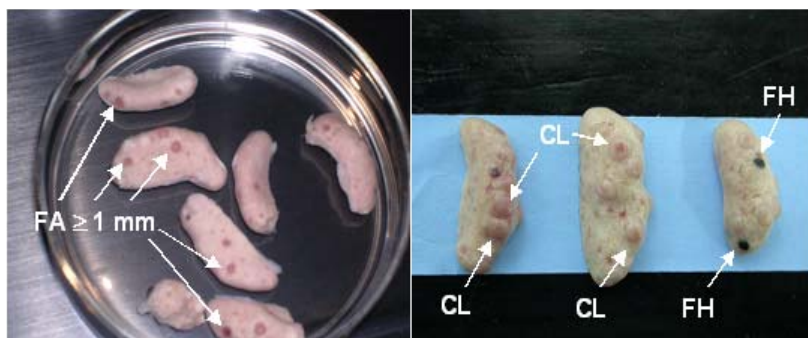


Figura 1: A) FA \geq 1 mm: folículos antrales mayores de 1 mm de diámetro. B) CL: cuerpos lúteos. FH: folículos hemorrágicos.

b) Punción ovárica y recogida de oocitos

Los oocitos inmaduros se obtuvieron mediante la aspiración del contenido de los folículos antrales visibles en la superficie del ovario superiores a 1 mm de diámetro como se puede ver en la Figura 1, siguiendo el procedimiento descrito por Jelinkova et al. (1994) con una aguja de 25 G conectada a una jeringa de 2 mL. Los complejos cúmulo-oocito (COC) recogidos fueron lavados en placas Petri de 35 mm (Nunc™ Surface, Nunc™, Roskilde, Dinamarca). El lavado se realizó con PBS + 0'1% de albúmina sérica bovina (BSA, Bovine Serum Albumine, Fraction V, > 96%) a 37°C. Posteriormente se maduraron en medio TCM-199 (Sigma M4530).

3.3.2.b.- Estudio del desarrollo embrionario preimplantacional

El resto del tracto reproductor fue separado de los ovarios para proceder a la recuperación de los embriones.

a) Recogida y recuento del número de embriones

Los embriones se recuperaron mediante lavado del tracto reproductor 48-72 horas después de la inseminación.

En segundo lugar, se determinó el número de embriones recuperados por hembra, que asociándolo con el valor de su tasa de ovulación se obtiene la tasa de recuperación.

b) Valoración morfológica de los embriones

Las placas donde fue recogido el medio de lavado se observaron con lupa binocular para localizar los embriones procedentes del lavado del tracto reproductor. Una vez localizados fueron transferidos a placas de cuatro pocillos (Nunc™ Surface, Nunc, Roskilde, Dinamarca) con medio de cultivo para realizar un lavado antes de situarlos en los pocillos donde se cultivaron.

Previamente a iniciar el cultivo se realizaron fotografías de cada uno de ellos para ser valorados posteriormente. De este modo, se reduce el posible estrés causado

por un tiempo excesivo fuera de las condiciones óptimas para el desarrollo de los mismos.

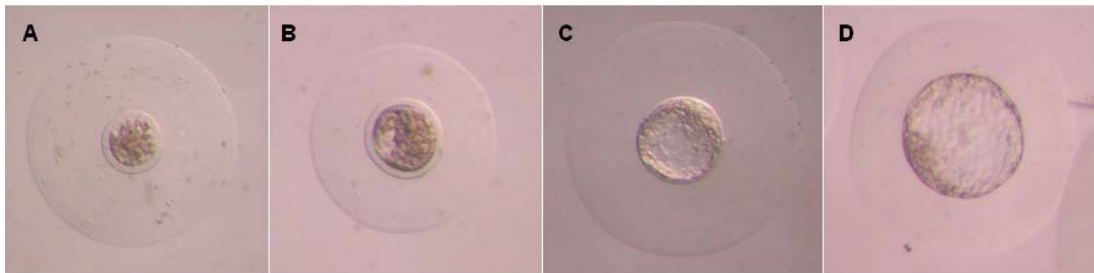


Figura 2: Embriones de coneja en distintos estadios rodeados de la capa de mucina. A) Mórula. B) Mórula cavitada. C) Blastocisto. D) Blastocisto expandido.

En este apartado se determinó la calidad y el desarrollo preimplantacional in vivo. Las observaciones se dieron en el tiempo 0 después de la obtención de los embriones desde el tracto reproductor y se determinaron el diámetro del embrión y el espesor de la capa de mucina (Figura 2 y 3) junto al estado de desarrollo y calidad que presentaron los embriones de los dos grupos de tratamiento.



Figura 3: Embrión rodeado de la capa de mucina.

3.3.3.- Estudio del desarrollo embrionario preimplantacional

a) Cultivo de embriones in vitro

Todos los embriones obtenidos se cultivaron en placas de cuatro pocillos con 500 µl de un medio basado en D-MEM + RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS) y 100 UI/ml de antibiótico/antimicótico (penicilina-estreptomicina-anfotericina B) durante 120 horas en un incubador a 38°C con un 5% de CO₂ en el aire y humedad máxima para evaluar su capacidad de desarrollo in vitro.

b) Determinación de la viabilidad y del desarrollo embrionario in vitro entre grupos

Los dos grupos de embriones (Control y Tratamiento), se dividieron en otros dos, Confort y Estrés Térmico, y se cultivan durante 120 horas.

En este apartado se determinó, en cada día de cultivo a la misma hora, las medidas del diámetro del embrión sin capa de mucina, espesor de la capa de mucina y diámetro total (resultante de la suma de las anteriores). Como se puede ver en la Figura 4, las mediciones se realizaban con buena precisión.

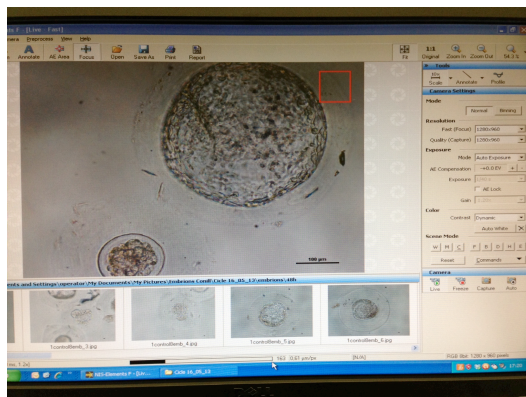


Figura 4: Pantalla del software usado en la realización de fotografías y medición de los embriones.

3.4. - ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis estadístico se opta por utilizar el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis Systems, SAS/STAT User's Guide, Release..., Inst. Inc, Cary NC, USA).

3.4.1.- Experimento 1

En los dos análisis del experimento 1, la variable independiente es el tratamiento, y hay dos niveles, control y tratamiento.

a) Fertilidad in vivo

La variable dependiente fertilidad es una variable cualitativa. El análisis de esta variable fue realizado por el procedimiento CADMOD del SAS, considerando a cada hembra como unidad experimental.

b) Prolificidad in vivo

Los datos referentes a prolificidad (NNV y NNT) presentaron una distribución normal. En este caso se utilizó el procedimiento GLM para determinar las diferencias de prolificidad respecto a los grupos, utilizando la coneja como unidad experimental.

3.4.2.- Experimento 2

Al igual que en el experimento 1, en este caso la variable objeto del estudio sigue siendo el tratamiento con propilenglicol respecto al control.

a) Tasa de ovulación, número de embriones y tasa de recuperación embrionaria

Las variables dependientes tasa de ovulación y número de embriones presentan una distribución de datos de tipo normal, mientras que la tasa de recuperación embrionaria presenta una distribución no paramétrica.

La variable independiente del tratamiento es de carácter cualitativo, por lo que a la hora de analizar los resultados se ha realizado un test t-Student para las dos variables normales, tasa de ovulación y número de embriones obtenidos, y una prueba de Wilcoxon para la variable con distribución no paramétrica.

b) Número de oocitos obtenido por punción ovárica

La variable dependiente número de oocitos inmaduros obtenidos se distribuye de forma normal y para analizar el efecto del tratamiento se realizó un GLM.

c) Calidad y desarrollo embrionario preimplantacional

La calidad y desarrollo embrionario preimplantacional se relacionan con el espesor de la capa de mucina y con la medida del diámetro del embrión a tiempo 0 respecto a su recuperación, respectivamente.

Por lo tanto, en este caso las variables dependientes fueron espesor de la capa de mucina y diámetro del embrión. El análisis de efectos del tratamiento sobre las dos variables se realizó por medio de una regresión logística múltiple.

3.4.3.- Experimento 3

En este experimento, se evalúan los 4 grupos de embriones mediante un diseño factorial, en el que se incluyen embriones procedentes de animales con tratamiento y control, divididos en 2 grupos de cultivo. Unos cultivados en condiciones de confort (38°C y 5% de CO₂) y otros cultivados en condiciones de estrés térmico (3 horas al día a 42.5°C y 5% de CO₂).

Por lo tanto en este experimento aparecen tres variables independientes: Tratamiento (Trat y PG), Tª cultivo (Cnf y HS), y Horas de cultivo (0, 24, 48, 72, 96 y 120h).

La evaluación de la respuesta a factores estresantes de los embriones se determinó mediante el análisis de la calidad embrionaria. Esta a su vez es categorizada en función del diámetro del embrión, del espesor de la capa de mucina y del diámetro

total. Además se determina también el % de embriones que llegan al estado de blastocisto expandido. Todo ello en función de las horas de cultivo.

Por lo tanto, las variables dependientes en este estudio son el diámetro del embrión, el espesor de la capa de mucina, el diámetro total del embrión y el porcentaje de embriones expandidos sobre el total del grupo.

Las cuatro variables se analizan por medio de una regresión logística múltiple.

a) Modelo de regresión logística múltiple

La interpretación de estos resultados se realizó mediante la creación de un complejo modelo estadístico con la finalidad de determinar la evolución de las medidas de los embriones en cultivo respecto a las tres variables independientes presentes en el experimento. Y el objetivo principal fue determinar el nivel de significancia sobre los resultados de cada una de las tres variables.

Los primeros modelos estudiados fueron los lineales, pero en ningún caso había una regresión satisfactoria. Seguidamente, se testaron modelos más complejos y se probó el modelo de regresión logística múltiple. La regresión logística es una técnica estadística que desde su primera aplicación a las ciencias de la salud en 1967, se ha extendido de manera vertiginosa, siendo en los últimos años la técnica de análisis estadístico multivariante más utilizada en las principales revistas científicas.

Lo primero a realizar fue la determinación de los coeficientes o estimadores de las variables, generando con el proceso el nivel de significancia de los mismos. La estimación de los coeficientes de regresión logística se realizó mediante el método de máxima verosimilitud.

Con la obtención de los coeficientes de regresión del modelo, éste queda ajustado. Seguidamente, con el modelo ajustado se consideró que los coeficientes tenían interés desde el punto de vista técnico, y posteriormente hubo que calcular la probabilidad de que fueran estadísticamente diferentes de cero, es decir, la significación estadística. La significación estadística de los estimadores se calculó mediante un contraste de hipótesis general del modelo, siendo la hipótesis nula que los coeficientes de todas las variables fueran iguales a cero. La hipótesis nula fue rechazada, lo que significa que al menos un coeficiente era distinto de cero. No obstante, el proceso continuó mediante la contrastación de los tres coeficientes uno a uno para determinar si había alguno igual a cero, lo cual se rechazó de nuevo.

Así pues, se obtuvo el modelo con los tres coeficientes ajustados y contrastados que fueran distintos a cero, es decir, que fueran significativos estadísticamente. Por otra parte, en todo modelo con dos variables o más hay que comprobar las posibles interacciones, ya que estas modifican los efectos observados; en este caso no se observó ninguna interacción entre variables por lo que se prosiguió con la interpretación del modelo generado.

b) Análisis e interpretación de los efectos

En el presente análisis estadístico se tienen dos variables cualitativas u ordinales. En realidad, los modelos de regresión con variables cualitativas definen implícitamente tantos modelos de regresión como categorías tiene la variable cualitativa codificada, o tantos modelos de regresión como combinaciones distintas de las categorías de las variables cualitativas codificadas. Para incluir una variable cualitativa en un modelo de regresión hay que definir tantas variables ficticias o dummy, como categorías tiene la variable cualitativa que se quiere introducir en el modelo de regresión. A estas variables se les denomina ficticias porque sus valores no son observables directos, sino una codificación que además puede hacerse de múltiples maneras.

En este caso habían dos variables ficticias, el tratamiento y el cultivo. Para introducirlas en el modelo se codificaron numéricamente con 1 y -1, representando el 1 al tratamiento con propilenglicol y al ambiente de cultivo confort (T^a homogénea de $38'5^{\circ}\text{C}$) y -1 al control y al ambiente de cultivo con estrés térmico ($42'5^{\circ}\text{C}$) durante tres horas al día.

En todos los estudios, se consideraron diferencias significativas a partir de $P < 0'05$. En todos ellos se expresan las medias junto al error estándar, aunque en algunos casos no es necesario puesto que se ha trabajado con una población total. El error estándar se utiliza cuando se quiere extrapolar la medida de una muestra sobre la población, es decir cuando se seleccionan animales aleatoriamente sobre una población para ser sometidos a un estudio (Álvarez, 2007).