



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**POSIBLE PARTICIPACIÓN DE LA HIPOXIA EN LA RESTRICCIÓN
DEL CRECIMIENTO INTRAUTERINO POR PREÑEZ MELLICERA
Y/O POR SUBNUTRICIÓN MATERNA EN OVEJAS**

Felipe Andrés Cerpa Águila

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: VÍCTOR HUGO PARRAGUEZ GAMBOA
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1160892

SANTIAGO, CHILE
AÑO 2018



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**POSIBLE PARTICIPACIÓN DE LA HIPOXIA EN LA RESTRICCIÓN
DEL CRECIMIENTO INTRAUTERINO POR PREÑEZ MELLICERA
Y/O POR SUBNUTRICIÓN MATERNA EN OVEJAS**

Felipe Andrés Cerpa Águila

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

NOTA FINAL:

PROFESOR GUÍA : DR. VÍCTOR PARRAGUEZ G.
PROFESOR CORRECTOR : DR. LUIS RAGGI S.
PROFESOR CORRECTOR : DR. GUSTAVO FARIAS R.

SANTIAGO, CHILE
AÑO 2018

MEMORIA DE TÍTULO

“POSIBLE PARTICIPACIÓN DE LA HIPOXIA EN LA RESTRICCIÓN DEL CRECIMIENTO INTRAUTERINO POR PREÑEZ MELLICERA Y/O POR SUBNUTRICIÓN MATERNA EN OVEJAS”.

“POSSIBLE PARTICIPATION OF HYPOXIA IN INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION CAUSED BY TWIN PREGNANCY AND / OR MATERNAL SUBNUTRITION IN SHEEP”.

Felipe Andrés Cerpa Águila*

* Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Financiamiento

Proyecto FONDECYT 1160892 “Roles of hypoxia and oxidative stress on lamb fetal growth restriction by twin pregnancy and/or undernutrition: intervention with antioxidants”.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a quienes me hacen ser quien soy y contribuyeron para dar este paso en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre y a mi padre, Fabiola “chuma” Águila Flores y Carlos “cucu” Cerpa Miranda, por no rendirse ante la adversidad, criarnos con amor, dedicación y afecto, en todo momento. Por enseñarnos a compartir, el respeto por los demás, la importancia de la autovalencia y el valor del trabajo en equipo, sin perder la esencia propia.

A mi mamá de amor, Lilian “gigi” Águila Flores, quien siempre nos entrega lo mejor.

A mi papá de amor, Germán “bananin” Duarte Romero, quien de una u otra forma ha estado y está presente en mi vida.

A mi abuela, Glafira “tita” Flores Silva, por su picardía y tolerar siempre todos nuestros caprichos.

A mi abuela y a mi abuelo, Carolina Miranda y Rafael Cerpa, quienes, a pesar de la distancia, siempre estuvieron presentes.

A mi hermano gemelo, Alexis “pipi” Cerpa Águila, quien es luz en mi vida.

A mi hermano menor, Ignacio “nacho” Cerpa Águila, quien me enseña y sorprende, a su manera.

A mi tío Hernán “yeyiye” Águila Flores y su hijo Octavio “pimo” Águila Valdés, por ser una fuente de inspiración, consecuencia y fortaleza.

A mis tíos Luis “Isis” Cerpa y María Teresa “tere” Armijo, por estar siempre presentes.

A mis tíos Patricio “pato” Cerpa y Ricardo “rica” Cerpa, por inculcarme el respeto hacia otras culturas e inspirarme a soñar.

A mis primos Isis “isito” Cerpa Armijo, Claudio “caco” Cerpa Armijo y Nicolás “nico” Cerpa Armijo, por ser unos hermanos más.

A mis amigos que comenzaron en la infancia, Miguel “keros” Verdugo Olea, Robinson “otacon” Iturrieta Yuretic, Rodrigo “hackroro” Iturrieta Yuretic, por el jugoso tarreístico y ampliar mis horizontes. A Enrique Lorca por PBIPIBPIBPIBPI wuo wuoo <3

A la tía del negocio del Liceo José Victorino Lastarria, quien nos abrió a la posibilidad de estudiar medicina veterinaria.

A la Mora y el Jake por fomentar mi interés por la medicina veterinaria, cada uno, además de mascota, fueron casos clínicos que marcaron mi de-formación profesional.

A los perros Simba, Mantequilla, Jabalí, Manjar, Fantasma, Calule, Nachito, Hiena, Zancudo y Candy, por acompañarnos tantos años en los pastos de FAVET.

A mis amigos que comenzaron en FAVET, “El grupo de los cuatro” que prácticamente pasábamos en el patio de comidas de algún mall, o estudiando en grupo en la casa o en los pastos de FAVET, Sara San Martín, el pilar moral e incondicional del grupo, siempre creando panoramas para disfrutar en conjunto, yendo por el buen camino (en su chubi), especialmente le agradezco por ayudarme a pasar matemáticas. La Carito Serendero, alma de la fiesta, en esa etapa de inocencia y descubrimiento siempre nos hacía reír con alguna talla “sanita”, Alexis Cerpa, mi partner de toda la vida y yo ☺. A “Los Piripis” / “El Liuco”, Pablo “weripi/cabecita” Dufflocq Urmeneta, Felipe “brocha/mixini” Pizarro Amaro, Emilio “Willy/tranquilou” Aguilar Troncoso, Dicrán “Diki/mamei” Baloían Gacitúa, y Raúl “Eye/BelloHombre” Guevara Moscoso y a todos los integrantes de “la office” basi, fritz, Iván, dari, vane, clau, vitoco, camiloski, pelu, koch, ale, carito y lalietor. Por ser quienes son, acompañarnos en nuestros caminos, y aguantarme siendo tan dispersín.

A Carolina “miamiam” Carvallo Santis, por ser un pilar incondicional.

A Ps. Ingrid Rojas, Ps. Isabel Pardo, Ps. Paola Rodriguez, Ps. Carolina Andrade, Dra. Beatriz Prieto y Dra. Marta Graber, por su apoyo, compromiso profesional e incluso personal.

A la red de apoyo sicoemocional y económico estudiantil de favet (en mi época) tía Sussy (exsecretaria de bienestar estudiantil), a la tía Estelita Lagos (asistente social), a Ingrid Rojas (sicóloga FAVET), por todas las conversaciones, contenciones, apoyo y consejos que me dieron durante mi formación profesional de médico veterinario.

A la tía Cristi, Santis y don Vicente, por contribuir a la malnutrición necesaria para rendir bien en las pruebas, estudiar hasta tarde y prestarnos las mesas y sillas cuando queríamos socializar.

A Jorge Cerda, por la buena disposición y prestancia para sacar las mejores fotocopias del campus sur (aunque fuera fiado).

A Valeria Rojas y Pablo Flores (CTI Favet), por disponer de un lugar agradable de trabajo y estudio.

A Felipe “grillo” Bravo Peña, por darme palabras de aliento cuando más las necesitaba. A Álvaro Villarroel, por las profundas reflexiones que compartimos cuando los cuestionamientos eran mayores a las certezas.

A mis amigos de la ANEVET, Cristián "cris" Villagrán, Tomás “tomi chico” Fernández, Martín “don centolla” León, Valentina “delfin” Cid, Catalina “gran valor” Fuentealba, Camila “karaoke” Mardones, y Jocelyn “squirtle” Atenas, por el compromiso e interés por construir un futuro mejor.

A mis amigos de COLMEVET, Yelmo Durán, Patricia Escárate, Claudio Poblete, Eduardo Álvarez, Carlos Flores, Pauline Romo, Pedro Quintana, Gustavo Boderó, Hugo Acevedo, María Luisa Sánchez, Claudia Parraguéz, Ana Rosas, Carlota Marcial, Maria “mary” López, por orientarme y mostrarme que si es posible lograr las metas.

A Patricio (ponle tu) Pérez, Mario Duchens, Alejandra (piñita) Marambio y Carolina (ricurita) Serendero, especialmente a ellas dos, por cuidarme y protegerme en las buenas y en las malas.

A Julio Larenas, Analía Henríquez y Francisco Carvalho, por transmitirme el gusto por la patología macroscópica y atender mis inquietudes formativas.

A Ana María Ramírez, Lorena Aguilar, Jose de los Cobos y Constanza “pelu” Cabello por Tantos buenos ñoños momentos en el departamento de patología diagnóstica.

A Jorge “mono” Mendoza Q.E.P.D, por compartir su experiencia y alentarme a continuar en la carrera.

A Santiago Urcelay, por enseñarme que “aunque las cosas parezcan gratis, alguien las tiene que pagar”.

A Jorge Sánchez, por su orientación y consejo cuando necesité su apoyo.

A Sonia Anticevic, Alicia Valdés y Alejandra Sepúlveda (yuyo) por darse el tiempo de atender mis inquietudes sobre medicina de animales de compañía, aunque no tuvieran tiempo.

A Héctor Adarnes y Marco Galleguillos, ya que, sin sus enseñanzas, la base molecular del metabolismo celular hubiese sido inentendible.

A Eduardo Kessi, por su introducción molecular a la biología celular, pero principalmente por haberme expulsado de la sala al pensar que estaba copiando en una prueba (cuando no fue así), y sacar a una compañera que estaba en la dirección de mi visión. Salomónicamente injusto. Eso me frustró tanto que tuve que esforzarme el doble para demostrarle lo contrario con mi rendimiento académico.

A Eileen Cofré Narbona, por orientarme, enseñarme y ayudarme efectivamente en este proceso de título, enseñándome el rigor del trabajo de laboratorio en investigación.

A Francisco Sales y su familia, por recibirme en Punta Arenas en el INIA Kampenaike, y el Congreso ALEPRyCS 2017. A la Dra. Sue McCoard por sus buenos deseos y compartir su conocimiento desinteresadamente. A Cristián y Pepelucho por ayudarnos en el INIA.

A todos los autores y colaboradores de los documentos científicos que utilicé para realizar mi memoria de título.

A mi profesor guía, Víctor Hugo Parraguez Gamboa, “el pelao ondero de lentes amarillos” por el buen trato, las conversaciones tan amenas, el compromiso formativo, por abrirme las puertas a su trabajo, guiarme en la búsqueda a la solución de problemas, recibirme en su oficina con buena música, y estar siempre disponible cuando lo necesité.

A mis profesores correctores por su indiscutible calidad humana. Luis Alberto Raggi, por mostrarme que el pensamiento lógico y sistemático “como una gota de mercurio” puede solucionar problemas complejos con ideas “simples”. A la profesora Bessie Urquieta (Q.E.P.D.), por su permanente disposición y capacidad de síntesis en el planteamiento de un problema. Al profesor Gustavo Farías, por todos los conocimientos y experiencias entregadas en este proceso formativo. Profe, la sufrí con su fisiopato... y mi hermano también. ...**Gracias familia y Universidad de Chile, especialmente FAVET.**

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN	11
ABSTRACT	133
1. INTRODUCCIÓN	155
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	166
2.1 Importancia de la placenta durante la gestación	166
2.2 Efecto de las gestaciones múltiples en el peso al nacimiento	177
2.3 Subnutrición materna	199
3. OBJETIVO GENERAL	20
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1 Análisis Estadístico	22
5. RESULTADOS	24
5.1 Variables maternas	24
5.2 Variables placentarias	26
5.3 Variables gasométrico-sanguíneas	30
5.4 Variables morfométricas	333
5.5 Consolidación de resultados	38
6. DISCUSIÓN	40
6.1 Posible presencia de hipoxia fetal en preñeces melliceras y rol de la hipoxia en preñeces bajo subnutrición	41
6.3 Relación entre hipoxia fetal y subnutrición materna, con restricción del crecimiento intrauterino	45
6.3.1 Relación entre hipoxia e IUGR	48
7. CONCLUSIÓN	52
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXOS	62
Anexo N°1: Certificado de Bioética	63
Anexo N°2: Efectos gestación única y mellicera y dietas control (100% NRC) y restringida (70% NRC) a los 100 días de gestación	64
Anexo N°3: Efectos gestación única y mellicera y dietas control (100% NRC) y restringida (70% NRC) a los 140 días de gestación.	65
Anexo N°4: Valores promedio de variables estudiadas a los 100 y 140 días de gestación.	66
Anexo N°5: Diferencia porcentual de variables a los 140 días respecto de los 100 días.	67
Anexo N°6: Diferencia porcentual de variables a los 140 días para los grupos CM, RU y RM respecto del grupo CU	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1: Peso (A) y condición corporal (B) de las ovejas a lo largo de la gestación.....	24
Figura N°2: Diferencia porcentual de valores promedio en variables maternas en los grupos CM, RU y RM respecto del grupo CU a los 140 días.....	25
Figura N°3: Peso placentario total por oveja	26
Figura N°4: Número de placentomas por oveja.....	26
Figura N°5: Peso placentario total por feto	27
Figura N°6: Número de placentomas por feto	27
Figura N°7: Proporción de placentomas según tipo	28
Figura N°8: Diferencia % de valores promedio en variables placentarias en los grupos CM, RU y RM respecto del grupo CU a los 140 días.....	29
Figura N°9: Presión de oxígeno en la vena umbilical a los 100 y 140 días	30
Figura N°10 Saturación de oxígeno en la vena umbilical a los 100 y 140 días.....	31
Figura N°11: pH de sangre (a), hematocrito (b) y pCO ₂ (c) proveniente de la vena umbilical a los 100 y 140 días de gestación.....	31
Figura N°12: Diferencia porcentual de valores promedio en variables gasométrico-sanguíneas en los grupos CM, RU y RM respecto del grupo CU a los 140 días	32
Figura N°13: Peso fetal en kilogramos a los 100 y 140 días de gestación	33
Figura N°14: Longitud cabeza-cola a los 100 y 140 días de gestación	34
Figura N°15: Largo de mano a los 100 y 140 días de gestación	34
Figura N°16: Largo de pata a los 100 y 140 días de gestación	35
Figura N°17: Perímetro torácico a los 100 y 140 días de gestación	36
Figura N°18: Diferencia porcentual de valores promedio en variables morfométricas en los grupos CM, RU y RM respecto del grupo CU a los 140 días	37
Figura N°19: Correlación lineal entre peso fetal y PO ₂ de la vena umbilical a los 140 días de gestación.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1: Efectos dietarios y del número de fetos respecto del grupo CU.....	38
Tabla N°2: Efectos dietarios en el grupo RM respecto del grupo CM.....	39

RESUMEN

En la producción ovina, la obtención de mellizos es una estrategia clave para mejorar la productividad predial. Sin embargo, los corderos mellizos nacen con menor peso que las crías gestadas individualmente, lo cual está asociado a mayor mortalidad perinatal, y en consecuencia se podría afectar negativamente la rentabilidad del sistema productivo. El desarrollo intrauterino de las crías depende principalmente de su potencial genético y de la disponibilidad de nutrientes y oxígeno. La transferencia de nutrientes y gases entre los compartimentos materno-fetal responde al flujo sanguíneo útero-placentario y a la capacidad (suficiencia) placentaria, por lo que la subnutrición materna y la insuficiencia placentaria pueden perjudicar el desarrollo de las crías al comprometerse el influjo de nutrientes y/o oxígeno.

Este estudio se realizó utilizando 64 ovejas de la raza Corriedale, categorizadas por gestación (única o mellicera). Las ovejas fueron sometidas a dos planos nutricionales desde el día 30 hasta el término de la gestación; uno cubre el ~70% y otro el ~100% de los requerimientos energético-proteicos de la oveja gestante. Además se evaluó el peso y la condición corporal de las ovejas cada 30 días. A los 100 y 140 días de gestación se realizaron cesáreas y se tomaron muestras sanguíneas desde la vena umbilical de cada feto, para evaluar variables asociadas a la oxigenación fetal (PO_2 , PCO_2 , saturación de hemoglobina con oxígeno, hematocrito y pH) y de la morfometría fetal (longitud cabeza-cola, perímetro torácico, largo de mano y largo de pata). Adicionalmente, a los 140 días de gestación se evaluó el peso y la morfología placentaria. Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), donde los factores fijos fueron el número de fetos en gestación (único o mellizos) y el plano nutricional (~70 ó ~100% de los requerimientos establecidos por el National Research Council, NRC), seguido del test post-hoc de Duncan para detección de diferencias entre grupos. Se consideraron diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$. A los 100 días de gestación, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables estudiadas. A los 140 días de gestación el peso de las ovejas alimentadas con dieta control (~100% NRC) fueron mayores que el de las ovejas alimentadas con dieta de restricción (~70% NRC). Las ovejas del grupo control gestación única (CU) presentaron la mayor condición corporal al compararse con

los demás grupos. Las ovejas de gestación mellicera presentaron mayores valores de peso placentario total por oveja y mayor número de placentomas por oveja que las de gestación única. Las ovejas de gestación única presentaron mayores valores de peso placentario total por feto y mayor número de placentomas por feto que las de gestación mellicera. Los tipos de placentomas predominantes en todos los grupos fueron los de tipo A y B, presentándose en menor proporción los C y D. Las concentraciones de oxígeno fetal fueron mayores en el grupo dieta control gestación única (CU) en comparación con los demás grupos experimentales. Además, se evidenció una correlación positiva, moderada ($r=0.459$) y estadísticamente significativa ($p=0.013$) entre la PO_2 de la vena umbilical y peso fetal a los 140 días de gestación. Los fetos gestados individualmente presentaron mayor peso que los obtenidos por gestación mellicera.

Palabras claves: Hipoxemia, hipoxia, subnutrición materna, insuficiencia placentaria, restricción del crecimiento intrauterino, gestación mellicera, ovinos.

ABSTRACT

In sheep production, obtaining twins is a key strategy to improve farm productivity. However, twin lambs are born lighter and smaller than singletons, which is associated with higher perinatal mortality, therefore the profitability of the productive system can be reduced. The intrauterine development of the offspring depends mainly on their genetic potential and the availability of nutrients and oxygen. The transfer of nutrients and gases between the maternal-fetal compartments responds to utero-placental blood flow and placental capacity (sufficiency), so that maternal undernourishment and placental insufficiency can adversely affect the development of the offspring by compromising the nutrient and/or oxygen influx.

This study was conducted on 60 corriedale bred sheep, separated by pregnancy rank (singleton or twin bearing). The sheep in this study underwent two nutritional plans from day 30 until the end of gestation, one that covered ~70% and another ~ 100% of the energetic-protein requirements of the pregnant sheep. The weight and body condition score of the sheep were evaluated every 30 days. At 100 and 140 days of gestation, caesarean sections were performed. Blood samples were collected from the umbilical vein of each fetus to evaluate variables associated with fetal oxygenation (PO_2 , PCO_2 , hemoglobin saturation with oxygen, hematocrit and pH). Fetal morphometric parameters were also measured (crown-rump length, thoracic perimeter, arm and leg length). Additionally, at 140 days of gestation, an evaluation of placental weight and morphology was performed. The results were evaluated by analysis of variance (ANOVA), where the fixed factors were the number of fetuses in gestation (single or twins) and the nutritional level (~70 or ~100% of the requirements established by the NRC), followed by the post-hoc Duncan test. Significant differences were considered at $p \leq 0.05$. At 100 days of gestation, no differences were evident in any of the variables studied. At 140 days of gestation the weight of the ewes fed with the control diet (~100% NRC) was greater than that of the ewes fed with the restriction diet (~70% NRC). The ewes from the single gestation control group (SC) had the highest body condition score when compared with the other groups. Twin-bearing ewes had higher values of total placental weight per sheep and a greater number of placentomes per sheep than those of single-gestation ewes. The single-gestation ewes had higher values

of total placental weight per fetus and more placentomes per fetus than twin-bearing ewes. The predominant type of placentome in all groups were A and B, with a lower proportion of C and D. Fetal oxygen concentrations were higher in the single gestation control group (SC) compared to the other experimental groups. In addition, there was a positive correlation ($r = 0.459$) and statistically significant ($p = 0.013$) between the PO_2 obtained from the umbilical vein and fetal weight at 140 days of gestation. All singletons were heavier than the twins.

Key words: Hypoxemia, hypoxia, maternal undernutrition, placental insufficiency, intrauterine growth restriction, twin pregnancy, sheep.

1. INTRODUCCIÓN

En los sistemas productivos ovinos se podría definir la eficiencia de producción como el número y peso de corderos destetados por hembra encastada al año. Así, el incremento en el tamaño de la camada se convierte en una opción para aumentar la producción y consecuentemente la rentabilidad del predio.

Las gestaciones múltiples son una opción atractiva para mejorar la eficiencia de producción por oveja, ya que los partos de ovejas melliceras en comparación a los partos individuales tienen mayor peso total de camada. Sin embargo, individualmente los mellizos tienen menor peso al nacimiento, lo que se asocia con mayores tasas de mortalidad. Además, los mellizos tardan más tiempo en alcanzar el peso comercial de venta y poseen una canal más liviana y magra en comparación a los ovinos gestados individualmente.

El crecimiento fetal está directamente relacionado con la disponibilidad de nutrientes y oxígeno materno, así como la habilidad de la placenta para transportar dichos compuestos desde la circulación materna hacia el feto. De este modo, al presentarse alteraciones en la entrega de nutrientes u oxígeno desde la madre hacia el feto, como ocurre en la subnutrición materna, disfunción placentaria o en las gestaciones múltiples, actuando en conjunto o por separado, pueden afectar negativamente el crecimiento fetal y consecuentemente el peso al nacimiento.

Debido a que, bajo condiciones climáticas extremas, como ocurre en la Patagonia Chilena, (lugar que concentra más del 50% de la ganadería ovina nacional), las gestaciones acontecen durante la época de menor oferta nutricional de la pradera, desarrollándose bajo restricción nutricional, por lo que se abordará el impacto de la subnutrición materna y el posible efecto de la hipoxia sobre el crecimiento y desarrollo fetal en gestaciones melliceras.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La duración promedio de la gestación ovina es de 147 días. Durante este período se desarrolla la futura cría y su placenta. No obstante, la dinámica de crecimiento de ambas estructuras no es sincrónica, ya que el mayor desarrollo placentario ocurre antes de la etapa de crecimiento exponencial fetal. Durante la primera mitad de la gestación el crecimiento fetal es lento, al final de este período éste tendría el 10% de su peso al nacimiento (Gootwine *et al.*, 2007). Sin embargo, es durante el último tercio de gestación que ocurre el crecimiento exponencial, período en el cual se evidencia una ganancia diaria de peso entre 70 a 150 g/día (Gootwine *et al.*, 2007).

La placenta por su parte incrementa progresivamente su peso, tamaño y superficie, desde el período peri-implantación (16 a 30 días de gestación), alcanzando su máximo tamaño entre los días 75-80 (Gootwine *et al.*, 2007). Es importante destacar que a medida que se desarrolla la placenta, va incrementando su vascularización en conjunto con un aumento en el flujo sanguíneo uterino para soportar adecuadamente el proceso de crecimiento fetal rápido (Reynolds *et al.*, 2006).

2.1 Importancia de la placenta durante la gestación

La implantación del embrión en la especie ovina ocurre entre los días 14-16 de gestación y se completa alrededor de los 22 días, iniciándose el proceso de placentación, que involucra el crecimiento y desarrollo placentario, resultando en la maduración de las unidades funcionales llamadas placentomas (Zhang *et al.*, 2015). Los placentomas son estructuras que contienen los complejos utero-placentarios responsables del intercambio de gases y micronutrientes. Cada placentoma está compuesto por dos partes, una materna (carúncula) y una fetal (cotiledón), las cuales crecen sincrónicamente entre el trofoblasto y el endometrio caruncular (Reynolds *et al.*, 2005).

El tipo de placentación en las ovejas es cotiledonario y no invasivo, donde las carúnculas endometriales maternas son sitios de anclaje para el trofoblasto del corion fetal, formándose entre 50 a 90 placentomas en las gestaciones individuales (Reynolds *et al.*, 2005). Existen dos capas en las vellosidades placentarias a través de las cuales deben atravesar los sustratos, gases y agua presentes en la circulación materna para llegar al feto. La primera capa cercana a la circulación materna está conformada por el sinciotrofoblasto, el cual

constituye el epitelio de transporte de la placenta. Después de su paso por el sincitiotrofoblasto, los sustratos deben atravesar la segunda capa celular, el epitelio capilar fetal, que es selectivamente permeable a moléculas como aminoácidos y glucosa, según el tamaño de la molécula. De este modo, funcionaría como una barrera restrictiva contra la difusión de moléculas de gran tamaño (Brett *et al.*, 2014).

El transporte de nutrientes a través de la placenta depende de su tamaño (peso), morfología (superficie de intercambio y grosor), capacidad/disponibilidad de transportadores de nutrientes y flujo sanguíneo utero-placento-fetal (Brett *et al.*, 2014). Debido a que la placenta es el órgano que transporta los nutrientes, gases respiratorios y desechos en la interfase materno-fetal, resulta fundamental el desarrollo del lecho vascular placentario (Reynolds *et al.*, 2005) ya que, es necesaria la adecuada aproximación de ambas circulaciones (Reynolds *et al.*, 2006) para realizar adecuadamente el transporte de sustratos requeridos para el crecimiento fetal: oxígeno, glucosa, aminoácidos y ácidos grasos. Los procesos de transporte dependen de las características de la placenta como el tamaño placentario, morfología, vascularidad y flujo sanguíneo (Zhang *et al.*, 2015). Respecto al tamaño placentario, el peso es un indicador de la superficie disponible para el intercambio de nutrientes materno-fetal. Si la placenta no alcanza un tamaño adecuado podría ponerse en riesgo el desarrollo del feto (Brett *et al.*, 2014). De este modo, el desarrollo vascular placentario y el tamaño placentario juegan un papel central en el adecuado intercambio transplacentario (Reynolds *et al.*, 2005). Su desarrollo deficiente podría conducir a un estado de restricción del crecimiento intrauterino (IUGR por sus sigla en inglés), causado por subnutrición o hipoxemia fetales, derivando finalmente en una disminución en el peso del feto.

2.2 Efecto de las gestaciones múltiples en el peso al nacimiento

Existe evidencia que el crecimiento y desarrollo fetal dependen de la compleja relación entre el sistema materno-utero-placentario-fetal. Desde esta perspectiva, las gestaciones individuales tendrían mayor disponibilidad de nutrientes, flujo sanguíneo y placentomas en comparación a gestaciones múltiples (Gootwine *et al.*, 2007). Es por esta competencia individual relativa, que los fetos en gestaciones múltiples sufrirán IUGR, dependiendo del tamaño de la camada, el cual se expresaría finalmente en menor peso individual al nacimiento.

Se ha evidenciado que en gestaciones múltiples cada feto dispondrá de una menor cantidad relativa de placentomas. Esto, porque el número de placentomas disponibles por individuo disminuye en promedio de ~70 para los fetos de gestación individual a ~40 para mellizos (Greenwood *et al.*, 2000). La disminución en el número de placentomas por feto está asociada con un aumento en el tamaño promedio de éstos y un aumento en la densidad vascular de los cotiledones (Virrenga *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar de este aumento de tamaño, las placentas de mellizos no alcanzarían la masa total de los placentomas presentes en gestaciones individuales (Gootwine *et al.*, 2007). Es de este modo que, las características placentarias de los fetos de gestaciones múltiples, podrían significar una entrega deficiente de nutrientes (subnutrición) y oxígeno (hipoxemia) para los fetos en desarrollo, derivando en una disminución del peso al nacimiento al compararlos con fetos provenientes de gestaciones individuales. Se ha evidenciado que, como resultado de gestaciones múltiples, cada feto tendrá un menor peso al nacimiento en comparación a un feto de gestación individual, ya que, los pesos promedio al nacimiento de corderos mellizos, trillizos y cuatrillizos corresponden respectivamente al 83%; 70% y 63% del peso de un feto gestado individualmente (Gootwine, 2005). No obstante, las gestaciones múltiples significan un mayor peso total de camada, el cual corresponde, en el caso de los mellizos ovinos a 1,6 veces el peso de un cordero gestado individualmente (Freetly y Leymaster, 2004).

En vista de lo anterior y desde un punto de vista productivo, resulta atractivo obtener gestaciones múltiples. Sin embargo, bajo condiciones de crianza en climas extremos (como ocurre en la Patagonia Chilena), la disminución del peso al nacimiento reduce la posibilidad de sobrevivencia de los mellizos (Claro, 1978). En las especies ganaderas, las crías nacidas con el peso promedio de la especie, o algo superior, presentan un incremento en la probabilidad de sobrevivir al compararse con las crías nacidas bajo el peso promedio (Vonnahme *et al.*, 2012). Como consecuencia, al obtener fetos con menor peso/tamaño al nacimiento se estaría poniendo en riesgo su sobrevida y finalmente, su comercialización. Es importante señalar que la disminución en el peso al nacimiento de corderos provenientes de gestaciones múltiples está asociada con un menor peso muscular al ser comparado con fetos provenientes de gestación individual (McCoard *et al.*, 1997).

2.3 Subnutrición materna

Las gestaciones invernales en sistemas basados en el pastoreo, como ocurre en Magallanes, se desarrollan con baja oferta nutricional de las pasturas, en relación a las demandas energéticas y/o proteicas de la madre y su feto (Dunlap *et al.*, 2015). Lo anterior significa una seria limitante, puesto que la restricción alimentaria durante la gestación ovina, resulta en disminuciones en el tamaño placentario, peso de los fetos y/o desarrollo vascular placentario (Clarke *et al.*, 1998; Arnold *et al.*, 2001), dependiendo del período gestacional en que ocurre. En efecto, la subnutrición materna puede llevar a IUGR, la cual se caracteriza en que el feto no alcanza el crecimiento de acuerdo con su potencial genético (Brett *et al.*, 2014), ya sea como consecuencia directa de la menor transferencia de nutrientes de la madre al feto, de hipoxia, o de ambas, dado el menor desarrollo placentario asociado a la subnutrición materna.

En vista de lo anteriormente expuesto, el presente estudio propone que en las gestaciones melliceras habría una mayor demanda de nutrientes y oxígeno en comparación a una gestación individual, lo que, sumado a la restricción nutricional materna ocurrida durante la gestación, debido a la alimentación con pasturas de baja calidad nutricional en Magallanes, afectarían negativamente el crecimiento y desarrollo embrio-fetal. Esto podría ocurrir por dos causas principales: la primera sería al comprometerse el desarrollo placentario, con la correspondiente disminución en el intercambio materno-fetal de nutrientes, gases (oxígeno principalmente) y metabolitos que utilizará el concepto durante su gestación. La segunda sería el efecto de la gestación múltiple, al desarrollarse una competencia nutricional relativa entre los animales en desarrollo. Ambas situaciones, en forma individual o en asociación, llevarían a la restricción del crecimiento intrauterino, dando como resultado, menores pesos al nacimiento.

3. OBJETIVO GENERAL

Establecer el posible rol de la hipoxia en la restricción del crecimiento fetal en ovinos por gestaciones de mellizos y/o restricción nutricional durante la gestación en ovejas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la posible presencia de hipoxia fetal en preñeces de mellizos.
2. Establecer el rol de la hipoxia en preñeces ovinas desarrolladas bajo subnutrición.
3. Relacionar la hipoxia fetal y la subnutrición materna con la restricción del crecimiento intrauterino.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los protocolos y actividades propuestas en esta sección se realizaron en la unidad de investigación ovina del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación (CRI) Kampenaike, en la región de Magallanes, Chile (Lat 52° 36'; Lon 70° 56').

Los animales considerados para este estudio fueron hembras ovinas de la raza Corriedale de entre 4 a 6 años. Durante la temporada reproductiva normal se seleccionaron desde el rebaño comercial un grupo de 64 ovejas con pesos y condición corporal similar (2,5-3), en la escala 1-5 descrita por Jefferies (1961). Su alimentación fue exclusivamente a pastoreo. Las pasturas empleadas se caracterizan por tener entre ~4-6% de proteína cruda (PC) y ~2,3 Mcal de energía metabolizable (EM) por kilogramo de materia seca. Se estima que la digestibilidad de la pradera debiera presentar valores de ~41-46%, pues la composición de la misma no ha variado respecto de la descrita previamente por Wernli *et al.* (1977). En la mitad de la temporada reproductiva, se indujo sincronización estral y superovulación en todas las ovejas. Esto se logró mediante la administración de una dosis intramuscular de un análogo de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) (125 μg cloprostenol, Estrumate®: ICI,

Macclesfield, U.K.) para inducir la luteólisis de los posibles cuerpos lúteos presentes en ese momento, seguido por la instalación de un dispositivo intravaginal con 0,3 g de progesterona (Eazi-breed™ CIDR® G, Pfizer Animal Health; New Zealand), el cual se mantuvo puesto durante 11 días para inducir y simular el período diestral. Posterior a la remoción de dicho dispositivo (Día 0), cada oveja recibió una inyección intramuscular con 400 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) (Novormon 5000®, Syntex, Argentina) (Saevre *et al.*, 2010) para inducir la ovulación múltiple.

Las hembras ovinas fueron encastadas mediante monta natural, utilizando 4 carneros de la raza Corriedale, de fertilidad probada, a los que se les pintó diariamente el pecho con una mezcla de aceite de comer y tierra de color, para marcar a las hembras montadas. El período de encaste fue de 4 días y el color de la pintura se cambió diariamente para tener certeza del día de monta y el posible día de inicio de la gestación.

Veintiocho días después de las montas, las ovejas fueron ecografiadas para evaluar número de embriones contenidos en el útero (único = U y mellizo = M). Los animales se ubicaron en potreros distintos según el plano nutricional al que fueron sometidos. La mitad de los animales fueron considerados como grupo de restricción nutricional, ya sea de gestación única o gestación mellicera (RU: n=16 y RM: n=16), pues su alimentación fue solo con pradera natural, cubriendo ~70% del requerimiento (NRC, 1985). La otra mitad de los animales se consideró como grupo control para cada condición gestacional (CU: n=16 y CM: n=16), los cuales se mantuvieron en base a la pradera natural con la adición diaria de una suplementación energético-proteico (Cosetan: 17% Proteína Cruda y 3,2 Mcal/Kg, Iansa) a modo de cubrir ~100% del requerimiento nutricional (NRC, 1985). El régimen alimentario experimental para cada grupo fue aplicado desde el día 28 de gestación, tras la evaluación ecográfica, hasta el final del experimento. Cada 30 días se evaluó el peso corporal y la condición corporal de las ovejas, a modo de ajustar la cantidad de suplemento alimentario en la medida que avanzó la gestación.

El número de animales por grupo se estimó sobre la base de la variabilidad del peso corporal al nacimiento y considerando un poder estadístico del 95% y $\alpha=0.05$ (Freitas de Melo *et al.*, 2015).

A los días 100 y 140 de gestación, se anestesió a la mitad de los animales de cada grupo (control y restringidos) según tiempo de gestación; CU=8, CM=8, RU=8 y RM=8 mediante una inyección intravenosa de ketamina (20 mg/kg de peso corporal). Posteriormente, se realizó una laparotomía ventro-medial y luego una histerotomía para acceder al feto. Tras la histerotomía se aisló el cordón umbilical para la obtención de muestras de sangre desde la arteria y vena umbilicales (1 mL) con jeringas heparinizadas para la medición de variables asociadas con el estado de oxigenación (PO_2 , PCO_2 , saturación de hemoglobina con oxígeno, hematocrito y pH), utilizando un analizador de gases *IL Synthesis 25 (Instrumentation Laboratory, Lexington, Massachusetts, USA)*, ajustado a la temperatura corporal ovina.

Posterior a ello, se extrajo el(los) feto(s) para ser eutanasiados por sobredosis de tiopental sódico, luego se secaron, pesaron, midieron y sexaron. En las ovejas de 100 días de gestación, se realizó una histerorrafia, seguida de la sutura de la pared abdominal. Finalizada la cirugía, se administraron antibióticos y analgésicos, supervisándose por un período de recuperación de 3 días. Luego de ello, fueron reincorporadas al rebaño general.

Las ovejas de 140 días de gestación fueron sometidas a eutanasia materna y posterior a ello, se removió el útero y placenta para la disección de sus placentomas, los cuales fueron clasificados morfológicamente en tipos A, B, C y D, de acuerdo con el criterio descrito por Vatnick *et al.* (1991). Se obtuvo el peso de cada placentoma y se registró según su clasificación.

4.1 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos para las variables estudiadas (gases sanguíneos fetales, pesos y medidas fetales al nacimiento, peso de la placenta y número de placentomas totales y por tipo) fueron analizados para verificar su ajuste a una distribución normal. De acuerdo con el resultado de esta prueba se realizaron comparaciones mediante pruebas paramétricas (ANOVA y test de Duncan), utilizando el software estadístico SPSS (IBM Corp, 2013). Las comparaciones realizadas en cada edad gestacional incluyeron dos factores cruzados: el tipo de gestación según el número de conceptos (individual y mellizos) y el nivel nutricional (~100% o ~70% NRC), así como la interacción entre ambos factores.

Para relacionar la presión parcial de oxígeno de la sangre fetal con la posible restricción de crecimiento intrauterino, se realizó un análisis de regresión lineal, considerando como variable independiente la PO₂ fetal y como variable dependiente el peso fetal a los 140 días de edad gestacional.

Se consideró una probabilidad de $p \leq 0,05$ para que dichos resultados fuesen estadísticamente significativos, los cuales se expresaron como medias \pm error estándar de la media.

5. RESULTADOS

5.1 Variables maternas

El peso de las ovejas durante el periodo experimental se presenta en la Figura 1A. En el primer periodo se observó un incremento de peso en todas las ovejas, tendencia que se mantuvo en los grupos control. Sin embargo, en los grupos restringidos el peso continuó sin cambios hasta el final de la gestación, lo que resultó en un peso significativamente menor al de las ovejas control en el día 140 ($p \leq 0,05$). En la figura 1B, se presenta el curso de la condición corporal (CC) de las ovejas. En los grupos restringidos, la CC presentó una tendencia a una leve disminución hasta el final de la gestación. Contrariamente, la CC de los grupos control incrementó durante el primer periodo, para luego presentarse sin variaciones, siendo significativamente mayores en los últimos tres puntos muestrales (día 77 de la gestación en adelante).

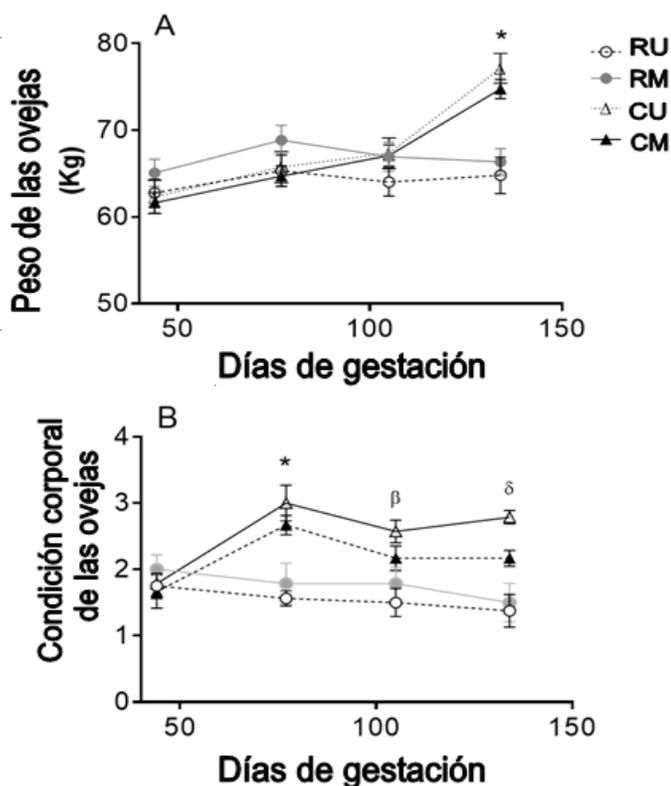


Figura N°1: Peso (A) y condición corporal (B) de las ovejas a lo largo de la gestación. Asterisco (*) indica diferencia significativa entre grupos suplementados y restringidos en el mismo tiempo muestral. β indica diferencia significativa entre grupos suplementados y

restringidos en el mismo tiempo muestral, pero RM y CM son iguales. δ indica diferencia significativa entre grupos suplementados y restringidos en el mismo tiempo muestral y CU también presenta diferencia con CM ($p \leq 0,05$).

En la Figura N°2 se puede observar la diferencia porcentual en los valores promedio del peso y la condición corporal de las ovejas a los 140 días de gestación de los grupos CM, RU y RM, respecto del grupo CU (línea base, 0%). El peso de las ovejas del grupo CM fue similar al CU, pero ambos grupos restringidos fueron significativamente más livianas (RU 15,98% y RM 13,99%). La condición corporal de los grupos CM, RM y RU fueron 30,22%, 46,04% y 50,72% menores. Mayor detalle en Anexo N°6 (Tabla N°9).

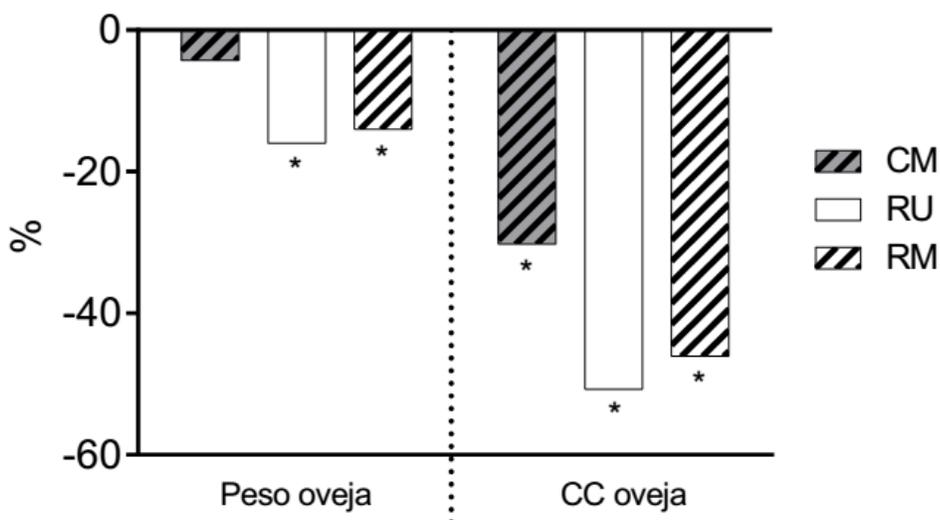


Figura N°2: Diferencia porcentual en los valores promedio en variables maternas en los grupos CM, RU y RM respecto del grupo CU a los 140 días. Asterisco (*) significa estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$).

5.2 Variables placentarias

En la Figura N°3 se puede observar que el peso placentario total por oveja fue significativamente mayor en los grupos de hembras que gestaron mellizos (CM y RM) ($p \leq 0,05$), respecto a las de gestación única. No se observaron diferencias significativas entre los grupos de dieta control o restringida para cada tipo de gestación, es decir entre CU y RU, como tampoco entre CM y RM. Para mayor detalle ver Anexo N°4 (Tabla N°5).

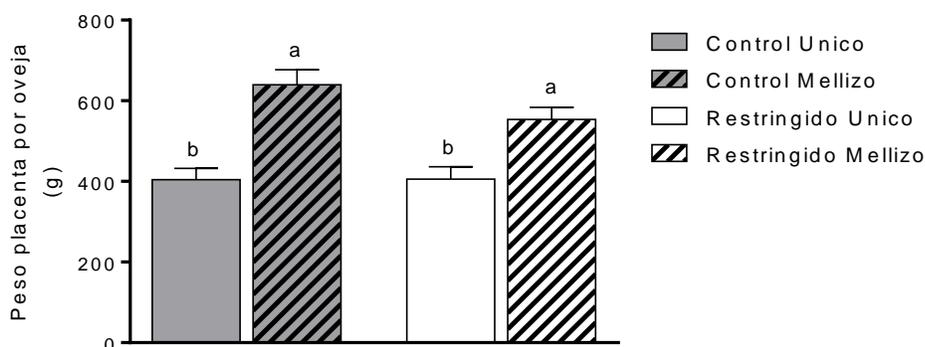


Figura N°3: Peso placentario total por oveja. Distintas letras representan diferencias significativas entre los grupos de estudio ($p \leq 0,05$).

En la Figura N°4 se puede observar que el número de placentomas por oveja fue significativamente mayor en los grupos de hembras que gestaron mellizos (CM y RM) y en las hembras de gestación única dieta control (CU) ($p \leq 0,05$). Además, comparando el plano alimentario (C y R) e igual tipo de gestación (U o M), se evidenció diferencia entre grupos de gestación única, es decir CU y RU ($p \leq 0,05$), pero no hubo diferencia entre las ovejas de gestación mellicera (CM y RM) ($p \leq 0,05$). Para mayor detalle ver Anexo N°4 (Tabla N°5).

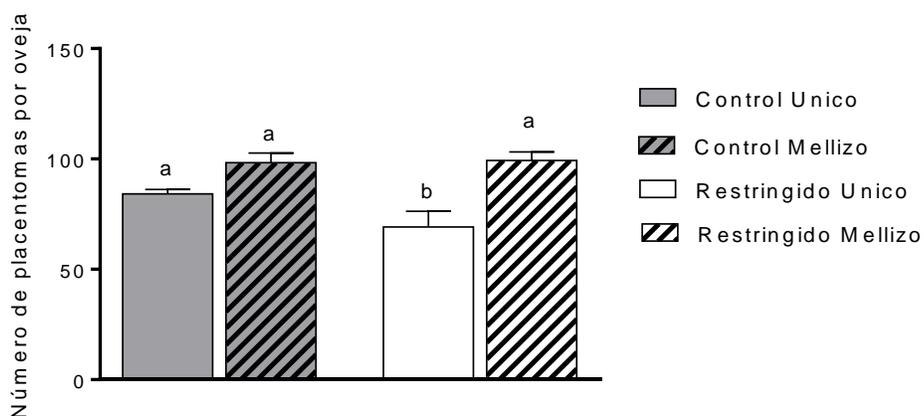


Figura N°4: Número de placentomas por oveja. Distintas letras representan diferencias entre grupos de estudio ($p \leq 0,05$).

En la Figura N°5 se puede observar que el peso placentario total por feto fue significativamente mayor en los grupos hembras de gestación individual (CU y RU) y también en las de gestación mellicera dieta control (CM) ($p \leq 0,05$). Además, se evidenció una diferencia significativa en las ovejas del grupo restringido para cada tipo de gestación, es decir entre RU y RM ($p \leq 0,05$). Para mayor detalle ver Anexo N°4 (Tabla N°5).

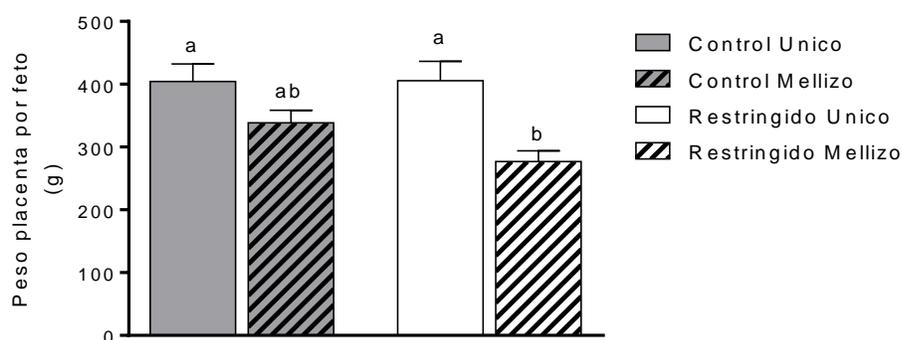


Figura N°5: Peso placentario total por feto. Distintas letras representan diferencias entre grupos de estudio ($p \leq 0,05$).

En la Figura N°6 se puede observar que el número de placentomas por feto fue significativamente mayor en los grupos de hembras de gestación individual (CU y RU), al compararlos con los grupos de gestación mellicera (CM y RM) ($p \leq 0,05$). Además, las ovejas del grupo RU presentaron valores significativamente menores que las ovejas CU ($p \leq 0,05$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos de gestación mellicera, para ambos planos nutricionales (CM y RM). Para mayor detalle ver Anexo N°4 (Tabla N°5).

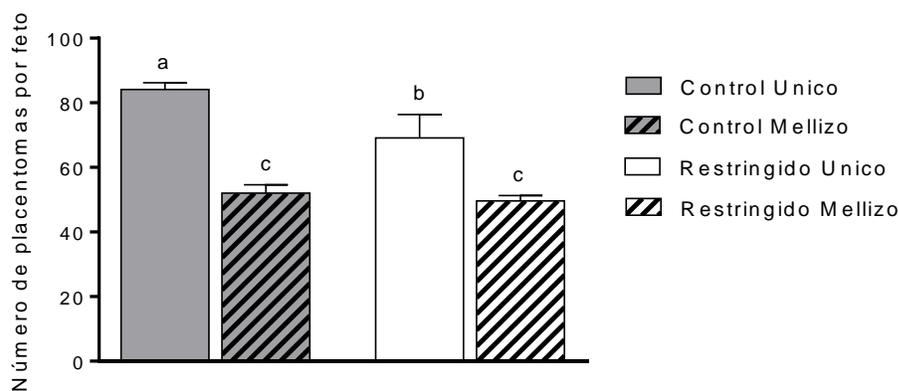


Figura N°6: Número de placentomas por feto, distintas letras representan diferencias entre grupos de estudio ($p \leq 0,05$).

La proporción de placentomas por tipo (A, B, C o D) respecto del total de placentomas por cada feto se representa en la Figura N° 7. Se puede observar que las gestaciones melliceras presentaron similar proporción de placentomas tipo B y C, independiente del plano nutricional. Tanto la dieta control como la de restricción, a pesar del número de crías, presentan respectivamente (CU con CM y RU con RM) una proporción similar de placentomas tipo A. El grupo RU presenta la mayor proporción de placentomas tipo A y B, mientras que presenta la menor de placentomas tipo C y D. Las ovejas del grupo CU presentaron la mayor proporción de placentomas tipo D. No se evidenció diferencia estadística en ningún caso ($p \leq 0,05$).

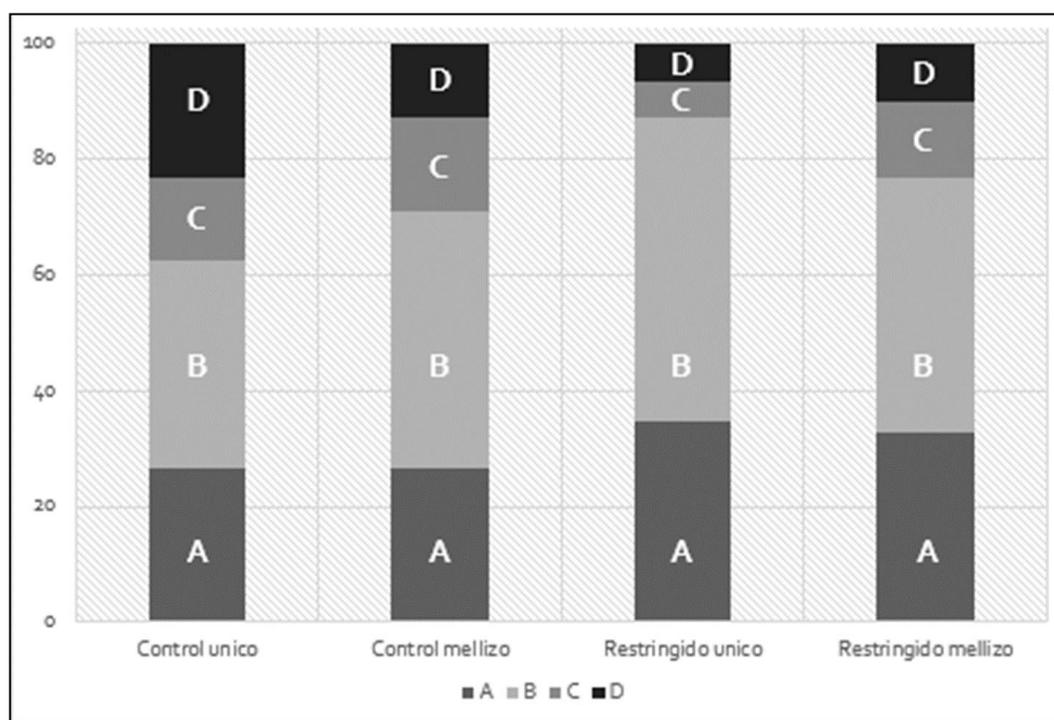


Figura N°7: Proporción de placentomas según tipo (A, B, C o D).

En la Figura N°8 se pueden observar las diferencias porcentuales en los valores promedio del peso placentario por oveja, peso placentario por feto, número de placentomas por oveja y número de placentomas por feto a los 140 días de gestación en los grupos CM, RU y RM, respecto del grupo CU (línea base, 0%). En las ovejas del grupo CM, el peso placentario total por oveja fue 57% mayor y el número de placentomas por feto 41,7% menor ($p \leq 0,05$). No obstante, el peso placentario por feto y el número total de placentomas por oveja no presentaron diferencias. Las ovejas del grupo RU no presentaron diferencias significativas en el peso placentario total por oveja ni en el peso placentario por feto. Sin embargo, el número total de placentomas por oveja, y por tanto el número de placentomas por feto, fueron 17,9% menores ($p \leq 0,05$). En las ovejas del grupo RM, el número total de placentomas por oveja no presentó diferencias. El peso placentario total por oveja fue 36,85% mayor y el peso placentario por feto con número de placentomas por feto fueron 31,58% y 41,67% respectivamente menores ($p \leq 0,05$). Mayor detalle en Anexo N°6 (Tabla N°9).

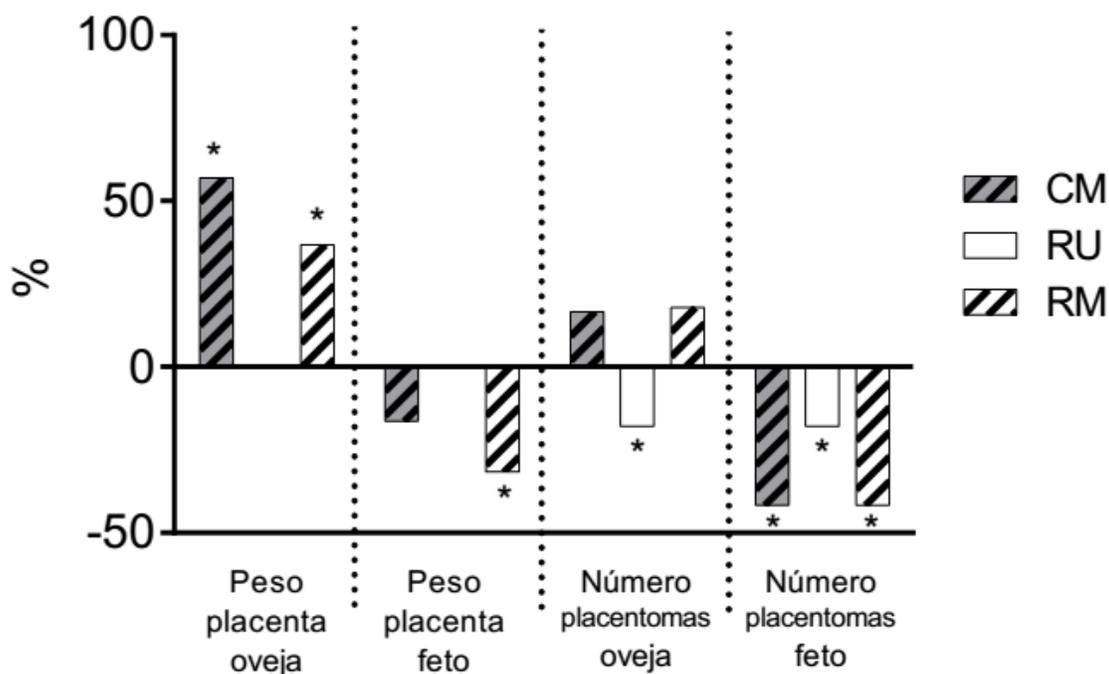


Figura N°8: Diferencia (%) de valores promedio en variables placentarias en los grupos CM, RU y RM respecto del grupo CU a los 140 días. Asterisco (*) significa estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$). ** variables sin barra indican diferencia $\leq 1\%$.

5.3 Variables gasométrico-sanguíneas

En la Figura N°9 se puede observar que la PO₂ umbilical venosa a los 100 días de gestación no presentó diferencias significativas en ninguno de los grupos ($p \leq 0,05$). Sin embargo, a los 140 días esta fue significativamente mayor en el grupo de hembras de gestación individual dieta control (CU) en relación a los grupos de ovejas melliceras (CM y RM), así como también, a ovejas de gestación única dieta de restricción (RU) ($p \leq 0,05$). Para mayor detalle ver Anexo N°4 (Tablas N°4 y N°6).

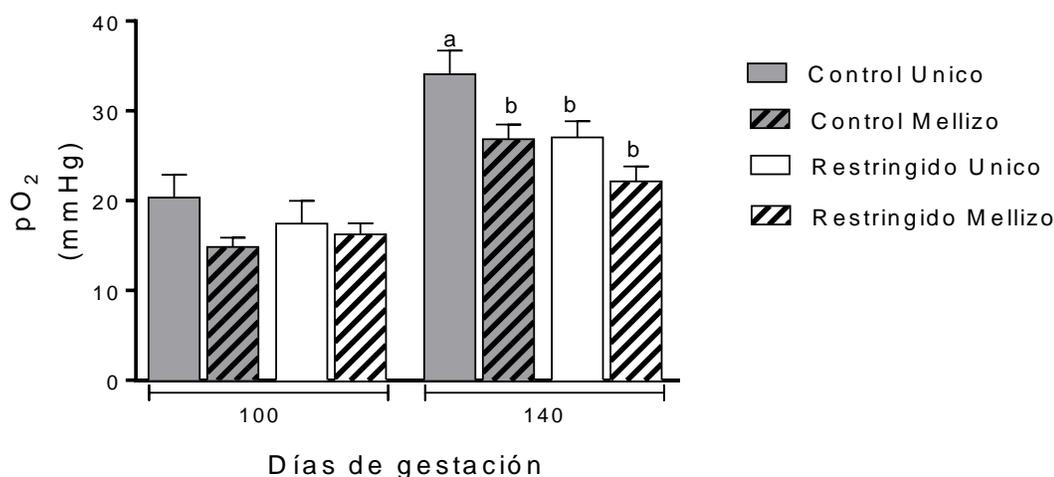


Figura N°9: Presión de oxígeno (PO₂) en la vena umbilical a los 100 y 140 días. Distintas letras representan diferencias dentro de cada edad gestacional ($p \leq 0,05$).

La saturación de la hemoglobina por oxígeno (SAT O₂) de la sangre umbilical venosa se presenta en la Figura N°10. Se puede observar a los 100 días de gestación la SAT O₂ no presentó diferencias significativas en ninguno de los grupos ($p \leq 0,05$). Sin embargo, a los 140 días fue significativamente mayor en el grupo de hembras de gestación individual dieta control (CU) en relación los grupos de ovejas melliceras (CM y RM), así como también, a ovejas de gestación única dieta de restricción (RU) ($p \leq 0,05$). Mayor detalle en Anexo N°4 (Tablas N°4 y N°6).

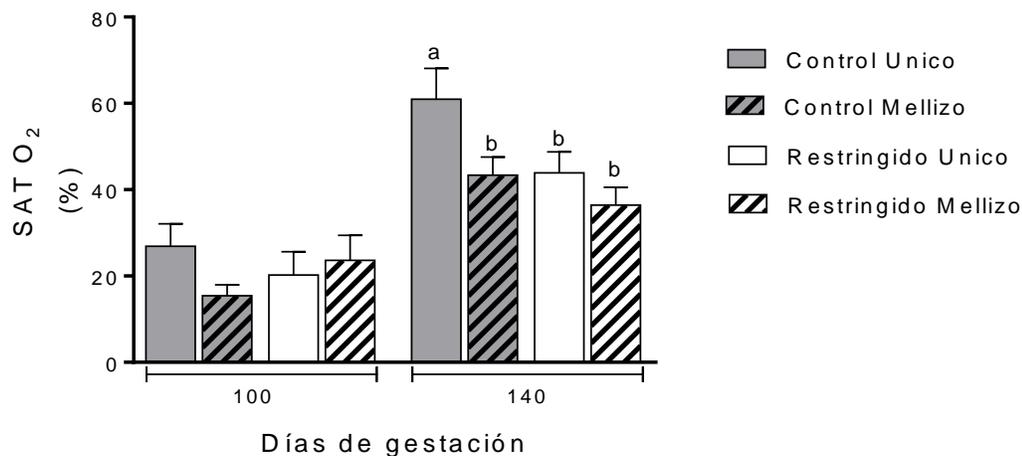


Figura N°10: Saturación de oxígeno (SAT O₂ %) en la vena umbilical a los 100 y 140 días. Distintas letras representan diferencias dentro de cada edad gestacional ($p \leq 0,05$).

En la Figura N°11 se puede observar el pH en sangre (panel a), hematocrito (panel b) y PCO₂ (panel c) proveniente de la vena umbilical a los 100 y 140 días de gestación, en ovejas de gestaciones únicas (U) y melliceras (M) sometidas a dieta de restricción (R= ~70% NRC) o dieta control (C= ~100% NRC). Tanto a los 100 como a los 140 días de gestación no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($p \leq 0,05$).

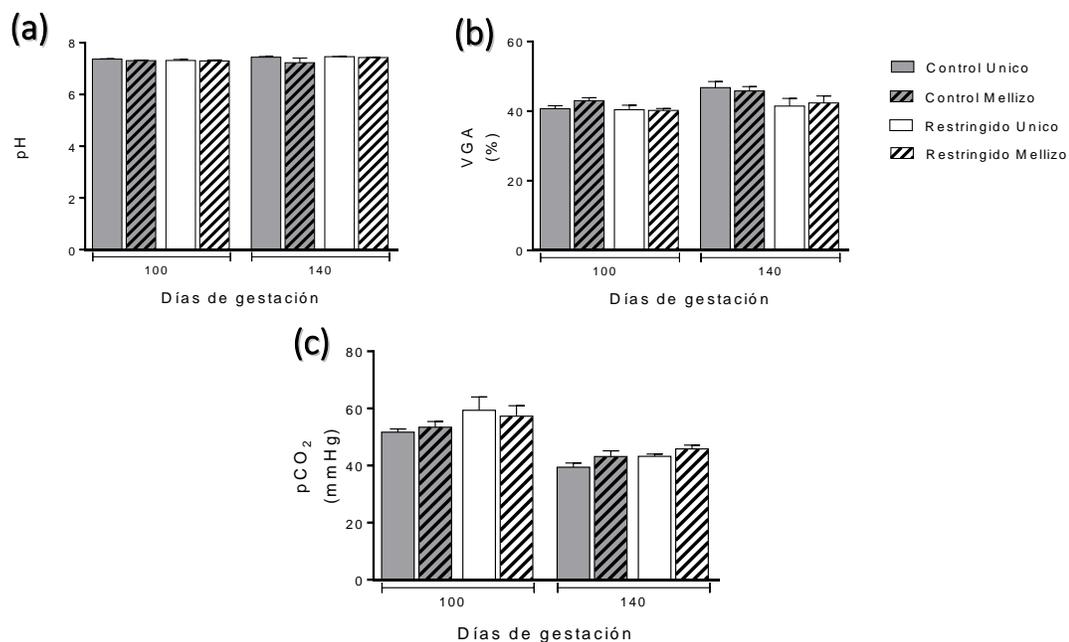


Figura N°11: pH de sangre (a), hematocrito (b) y PCO₂ (c) proveniente de la vena umbilical a los 100 y 140 días de gestación.

Las diferencias porcentuales en los valores promedio de la PO₂, SAT O₂, PCO₂, pH y VGA a los 140 días de gestación respecto del grupo CU (línea base, 0%) se presentan en la Figura N° 12. En las ovejas del grupo CM, la PO₂ y la SAT O₂ resultaron 21,3% y 28,8% respectivamente menores ($p \leq 0,05$). En las ovejas del grupo RU, la PO₂ y la SAT O₂ fueron 20,7% y 27,9% respectivamente menores ($p \leq 0,05$). Para las ovejas del grupo RM, la PO₂ y la SAT O₂ resultaron 35% y 40,2% respectivamente menores ($p \leq 0,05$). Sin embargo, para las variables PCO₂, pH y VGA no se evidenciaron diferencias en ningún grupo. Para mayor detalle ver Anexo N°6 (Tabla N°10).

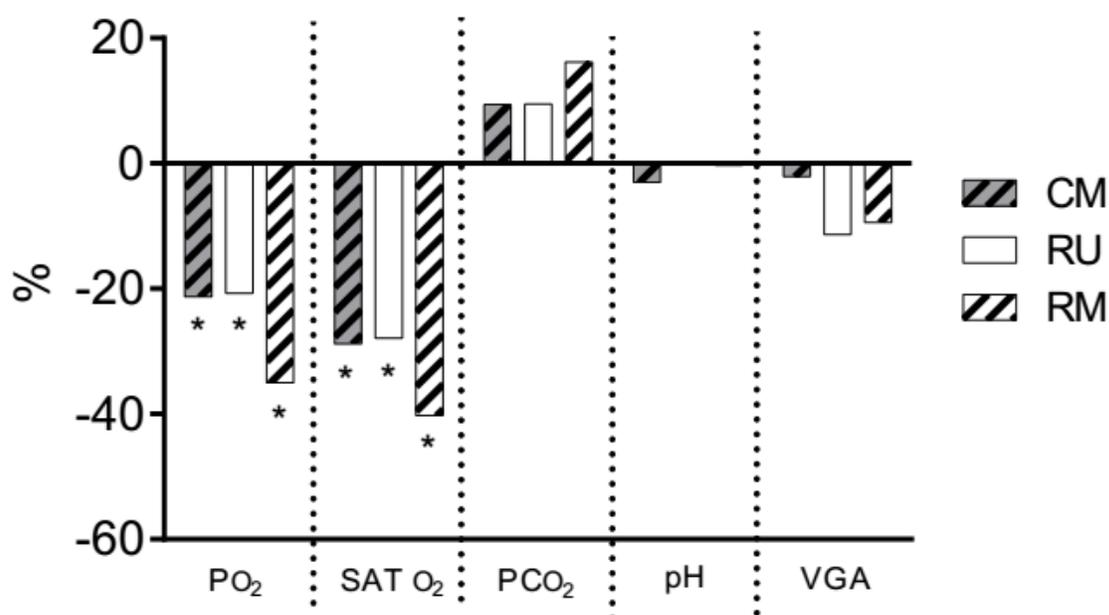


Figura N°12: Diferencia porcentual de valores promedio en variables gasométrico-sanguíneas en los grupos CM, RU y RM respecto del grupo CU a los 140 días. Asterisco (*) significa estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$) **variables sin barra representa diferencia $< 1\%$.

5.4 Variables morfométricas

En la Figura N°13 se puede observar que el peso fetal a los 100 días de gestación no presentó diferencias significativas en ninguno de los grupos ($p \leq 0,05$). No obstante, a los 140 días fue significativamente mayor en los grupos de hembras de gestación individual para cada plano nutricional, en relación a los de gestación mellicera, es decir, al comparar los grupos CU con CM y los grupos RU con RM ($p \leq 0,05$). Además, se puede observar que existe diferencia significativa en los grupos de hembras de gestación mellicera para cada plano nutricional (CM y RM) ($p \leq 0,05$). Para mayor detalle ver Anexo N°4 (Tablas N°4 y N°6).

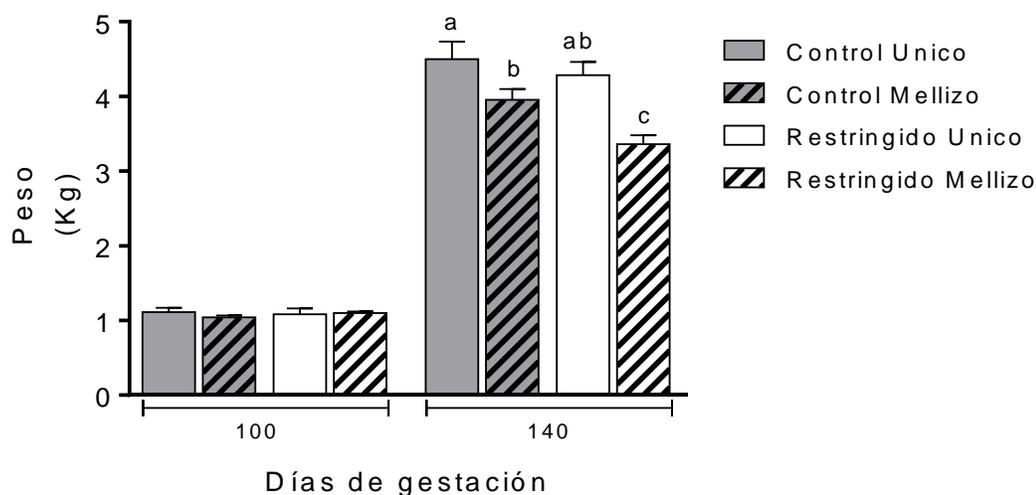


Figura N°13: Peso fetal en kilogramos a los 100 y 140 días de gestación. Distintas letras representan diferencias dentro de cada edad gestacional ($p \leq 0,05$).

La longitud cabeza-cola fetal se muestra en la Figura N°14. A los 100 días de gestación no presentó diferencias significativas en ninguno de los grupos ($p \leq 0,05$). Por otra parte, a los 140 días fue significativamente mayor en los grupos de hembras de gestación individual para cada plano nutricional (CU y RU), y también en las de gestación mellicera con dieta control (CM), resultando menor en el grupo de hembras melliceras con dieta de restricción (RM) ($p \leq 0,05$). Para mayor detalle ver Anexo N°4 (Tablas N°4 y N°6).

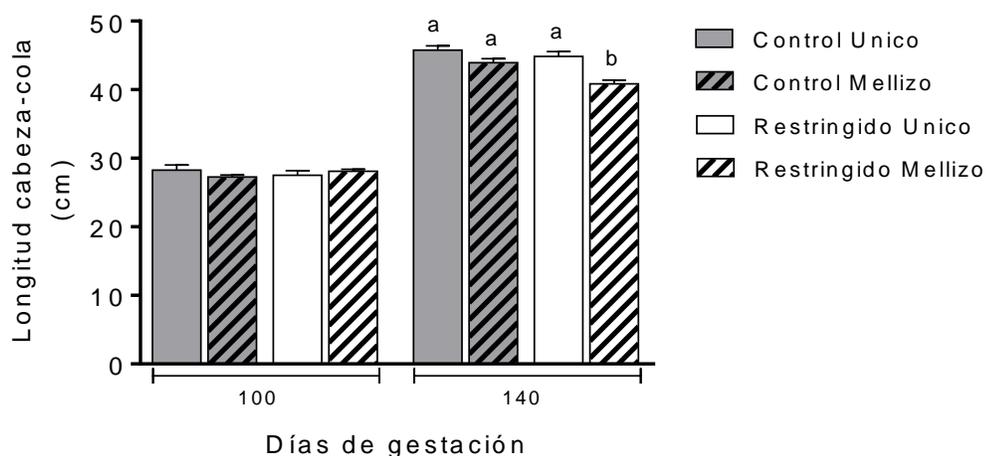


Figura N°14: Longitud cabeza-cola a los 100 y 140 días de gestación. Distintas letras representan diferencias dentro de cada edad gestacional ($p \leq 0,05$).

En la Figura N°15 se presenta la variable largo de mano fetal. Se puede observar que el largo de mano a los 100 días de gestación no presentó diferencias significativas en ninguno de los grupos ($p \leq 0,05$). Por otro lado, a los 140 días fue significativamente mayor en los grupos de hembras de gestación individual para cada plano nutricional (CU y RU), y también en las de gestación mellicera con dieta control (CM), resultando menor en el grupo de hembras melliceras con dieta de restricción (RM) ($p \leq 0,05$). Para mayor detalle ver Anexo N°4 (Tablas N°4 y N°6).

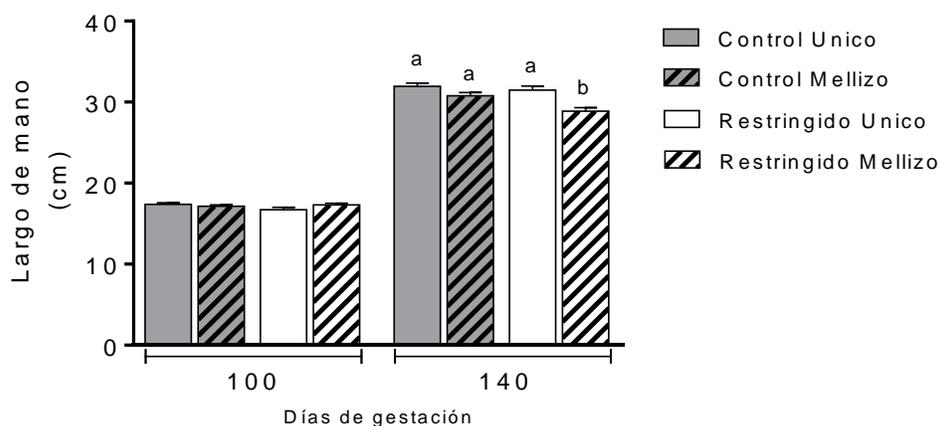


Figura N°15: Largo de mano a los 100 y 140 días de gestación. Distintas letras representan diferencias dentro de cada edad gestacional ($p \leq 0,05$).

El largo de pata fetal se presenta en la Figura N°16, donde se puede observar a los 100 días de gestación esta característica no presentó diferencias significativas en ninguno de los grupos ($p \leq 0,05$). Sin embargo, a los 140 días fue significativamente mayor en los grupos de hembras de gestación individual para cada plano nutricional en relación a las gestaciones melliceras, es decir, al comparar los grupos CU con CM y los grupos RU con RM ($p \leq 0,05$). Además, no se encontraron diferencias en las gestaciones del mismo tipo y distinto plano nutricional, es decir, al comparar CU con RU y CM con RM. Para mayor detalle ver Anexo N°4 (Tablas N°4 y N°6).

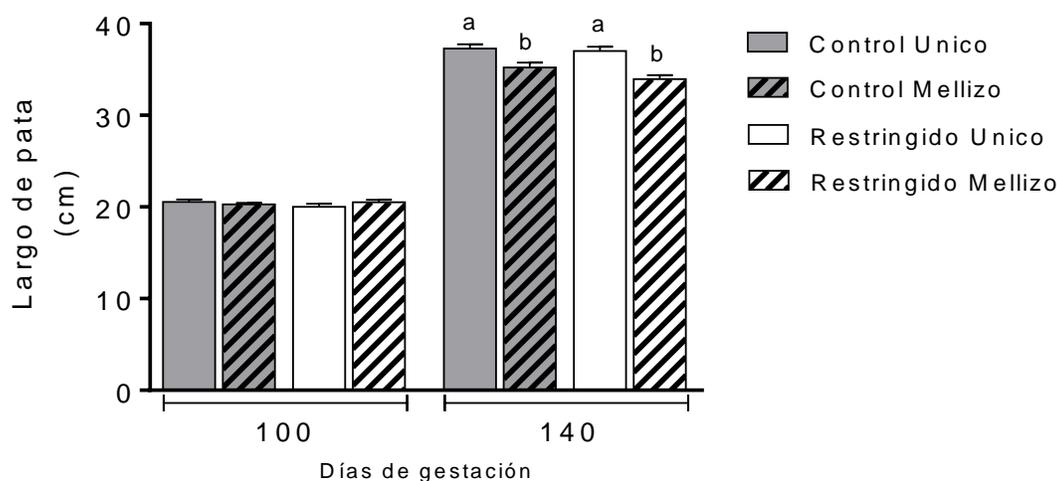


Figura N°16: Largo de pata a los 100 y 140 días de gestación. Distintas letras representan diferencias dentro de cada edad gestacional ($p \leq 0,05$).

Respecto del perímetro torácico (Figura N°17), se puede observar que a los 100 días de gestación no presentó diferencias significativas en ninguno de los grupos ($p \leq 0,05$). Por otra parte, a los 140 días fue significativamente mayor en los grupos de hembras de gestación individual dieta control (CU) ($p \leq 0,05$). Adicionalmente, se encontraron diferencias significativas entre los grupos de dieta control y restringido para cada tipo de gestación, es decir, al comparar CU con CM y RU con RM) ($p \leq 0,05$). No se encontraron diferencias en las gestaciones del mismo tipo y distinto plano nutricional, es decir, al comparar CU con RU y CM con RM. Para mayor detalle ver Anexo N°4 (Tablas N°4 y N°6).

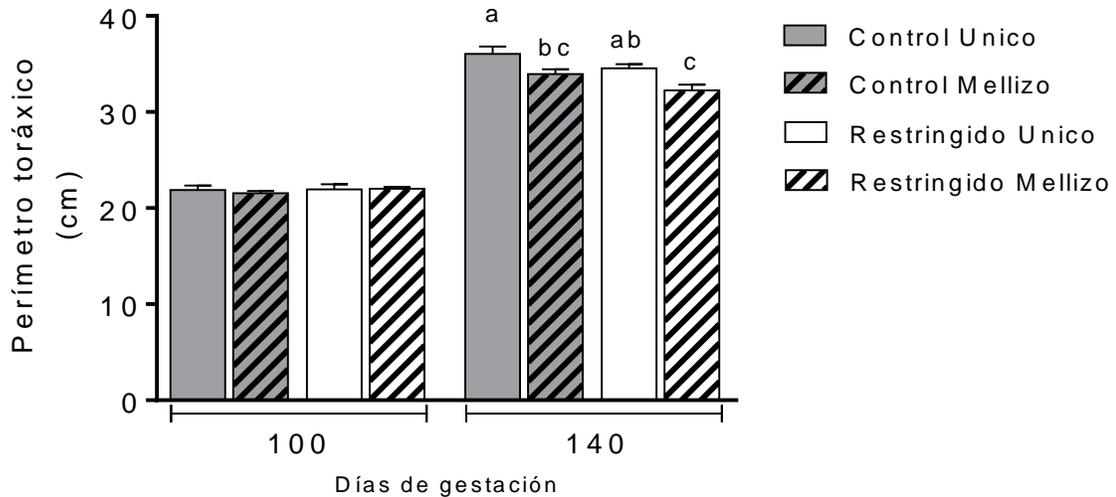


Figura N°17: Perímetro torácico a los 100 y 140 días de gestación. Distintas letras representan diferencias dentro de cada edad gestacional ($p \leq 0,05$).

En la Figura N°18 se pueden observar la diferencias porcentuales en los valores promedio del peso fetal, longitud cabeza-cola, largo mano, largo pata y perímetro torácico a los 140 días de gestación en los grupos CM, RU y RM, respecto del grupo CU (línea base, 0%). En las ovejas del grupo CM, las variables peso fetal, largo de pata, y perímetro torácico fueron 12,2%, 5,5%, y 5,8% respectivamente menores ($p \leq 0,05$). No obstante, el largo cabeza-cola y largo de mano no presentaron diferencias. En las ovejas del grupo RU, las características El peso fetal, largo de mano, largo de pata, largo cabeza-cola y perímetro torácico no presentan diferencias. Finalmente, las variables peso fetal, largo de mano, largo de pata, largo cabeza-cola y perímetro torácico en las ovejas del grupo RM, fueron 25,3%, 10,7%, 9,5%, 9%, y 10,5% respectivamente menores ($p \leq 0,05$). Para mayor detalle ver Anexo N°6 (Tabla N°10).

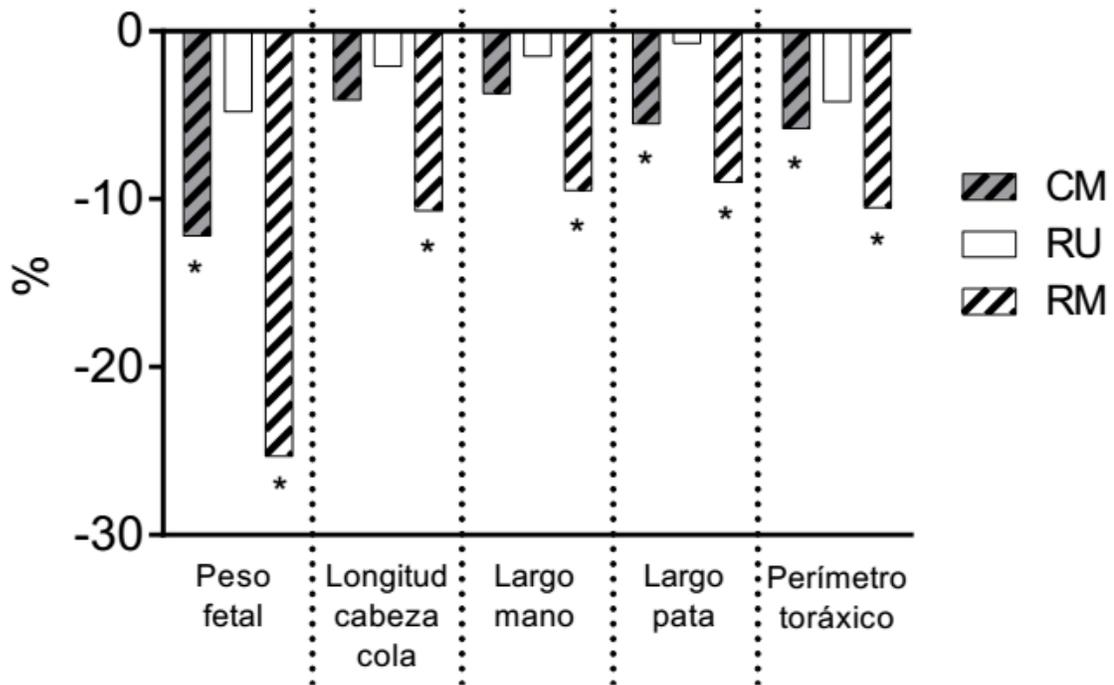


Figura N°18: Diferencia porcentual de valores promedio en variables morfométricas en los grupos CM, RU y RM respecto del grupo CU a los 140 días. Asterisco (*) significa estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$).

5.5 Consolidación de resultados

En la figura N°19 se representa la correlación lineal entre PO₂ y peso fetal a los 140 días de gestación, la cual indica que existe una correlación positiva y moderada ($r=0.459$) y estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$).

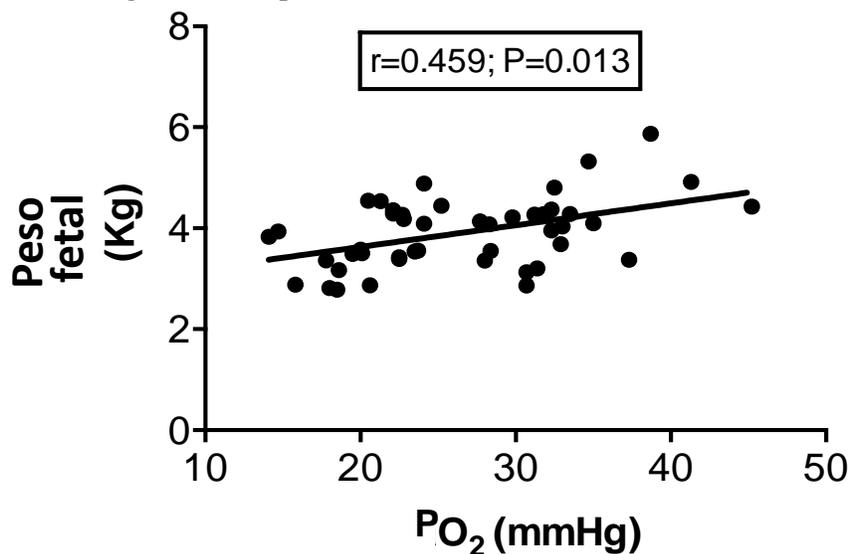


Figura N°19: Correlación lineal entre peso fetal y PO₂ de la vena umbilical a los 140 días de gestación.

En la tabla N°1 se presenta un resumen del análisis de las variables estudiadas en los grupos CM, RU y RM respecto al grupo CU a los 140 días de gestación, evaluando la posible presencia de la subnutrición materna, insuficiencia placentaria, hipoxemia fetal y/o restricción del crecimiento intrauterino (IUGR) en función de los resultados expuestos.

Grupo	Subnutrición materna	Insuficiencia placentaria	Hipoxemia	IUGR
CM	NO	SI	SI	SI
RU	SI	SI	SI	NO
RM	SI	SI	SI	SI

Tabla N°1: Efectos dietarios y del número de fetos respecto del grupo CU a los 140 días.

Todos los grupos mostraron hipoxemia, lo cual puede atribuirse a la insuficiencia placentaria concomitante. Sin embargo, la insuficiencia placentaria no fue suficiente para

alterar la PCO₂, lo cual podría explicarse por alteraciones vasculares placentarias o por alteraciones en el gradiente de difusión (concentración) de O₂ a nivel materno-placentario-fetal, ya que el CO₂ posee mayor afinidad por la hemoglobina que el oxígeno. Además, las alteraciones presentes en la PO₂, PCO₂, y SAT O₂ no fueron suficientes para modificar significativamente el VGA ni pH. El grupo CM a pesar de no presentar subnutrición materna, su placenta sería menos eficiente por feto que la de CU, ya que los fetos fueron hipoxémicos y sufrieron restricción del crecimiento intrauterino, lo cual, es explicado en parte por la competencia fetal relativa de las gestaciones múltiples. El grupo RU a pesar de presentar subnutrición materna e insuficiencia placentaria no evidenció restricción del crecimiento intrauterino. En consecuencia, y bajo estas condiciones experimentales, la disminución de la condición corporal materna observada en el último tercio de la gestación sería suficiente para evitar la IUGR al cubrir los requerimientos fetales durante el período de crecimiento exponencial. El grupo RM presentó subnutrición materna, insuficiencia placentaria, hipoxemia y restricción del crecimiento intrauterino. Aparentemente, el desarrollo placentario fue insuficiente para abastecer adecuadamente los requerimientos fetales, esto pues la dieta suministrada en el primer tercio de gestación pareciera ser inapropiada para el correcto desarrollo placentario. Además, la condición nutricional previa de la madre y la dieta suministrada en el último tercio de gestación, fueron en conjunto, insuficientes para evitar el desarrollo de IUGR en gestaciones melliceras. Como hallazgo transversal, se puede señalar que, considerando los valores de la morfometría fetal a los 100 y 140 días se puede desprender que, independiente del plano nutricional o tipo de gestación, la insuficiencia placentaria y/o el desarrollo de una gestación con IUGR, sólo se hace evidente cuando aumentan las exigencias nutricionales fetales, debido al crecimiento exponencial fetal durante el último tercio de gestación.

En la tabla (N°2) se presenta un resumen del análisis de las variables estudiadas del grupo RM respecto del grupo CM (efecto dieta) a los 140 días de gestación.

Grupo	Subnutrición materna	Insuficiencia placentaria	Hipoxemia	IUGR
RM	SI	NO	NO	SI

Tabla N°2: Efectos dietarios en el grupo RM respecto del grupo CM a los 140 días

Al comparar el grupo CM con RM (efecto dieta de restricción con gestación mellicera) a los 140 días de gestación se puede desprender que el peso de las ovejas del grupo RM es 10,13% menor ($p \leq 0,05$). Además, la condición corporal no presenta diferencia estadística. Sin embargo, los valores comparados a los 140 y 100 días indican que la condición corporal de las ovejas disminuyó un 25% en RM y se mantuvo en CM, para mayor detalle ver Anexo N°5 (tabla N°7). Por otra parte, el peso placentario total por oveja, peso placentario por feto, número de placentomas por feto y número total de placentomas por oveja no presentaron diferencia ($p \leq 0,05$). También, la PO_2 , SAT O_2 , PCO_2 , pH y VGA no presentaron diferencia ($p \leq 0,05$) y el peso fetal, longitud cabeza-cola, largo de mano, largo de pata, y perímetro torácico son 14,94%, 6,9%, 6,1%, 3,7%, y 5.0% respectivamente menores ($p \leq 0,05$). Para mayor detalle ver Anexo N°5 (tabla N°8). De ese análisis, se puede desprender que en gestaciones melliceras, la subnutrición materna por si sola acentúa la IUGR debido a la competencia fetal relativa propia de las gestaciones múltiples.

6. DISCUSIÓN

De acuerdo con la bibliografía revisada, este es el primer estudio en evaluar crecimiento fetal, gasometría venosa umbilical fetal y desarrollo placentario, para relacionarlos con los efectos derivados de la subnutrición materna y gestaciones melliceras tanto a los 100 como a los 140 días de gestación y la restricción del crecimiento intrauterino en ovinos. El hallazgo principal de este estudio es la presencia de hipoxemia a los 140 días de gestación en mellizos, independientemente del plano nutricional de la madre y también en gestaciones individuales cuyas madres fueron sometidas a subnutrición durante todo el período gestacional.

A continuación se presenta una discusión para los resultados obtenidos, organizada según cada uno de los objetivos de la presente memoria.

6.1 Posible presencia de hipoxia fetal en preñeces melliceras y rol de la hipoxia en preñeces bajo subnutrición.

La medición de parámetros gasométricos (PO_2 , SAT O_2 , pH, PCO_2 , concentración de Hb) y morfométricos (largo cabeza-cola, largo mano, largo pata, y perímetro torácico) se efectuó a los 100 y 140 días de gestación, puesto que está ampliamente aceptado que a los 100 días de gestación la placenta ovina estaría plenamente desarrollada, por lo tanto, estudiarlas en ese momento entregaría una visión general del intercambio materno-fetal de gases y nutrientes, cuando las demandas fetales aún no son muy altas, pues el tamaño fetal aun es pequeño. La medición de las mismas variables antes mencionadas al término de la gestación (140 días), permite conocer el comportamiento de la eficiencia placentaria cuando las demandas fetales por nutrientes y oxígeno son máximas.

Los resultados de este experimento mostraron que en los gases a los 100 días de gestación, aun cuando se observa cierta tendencia a menores valores de PO_2 y SAT O_2 en las preñeces RU y en melliceras para ambos planos nutricionales (CM y RM), estas diferencias no son estadísticamente significativas. Por otra parte, a los 140 días de gestación, tanto la PO_2 y la SAT O_2 venosas umbilicales fueron significativamente menores ($p \leq 0,05$) en preñeces RU y en preñeces melliceras, independiente del plano nutricional (CM y RM) respecto al grupo CU. Es decir, tanto el nivel de subnutrición materna, como la gestación mellicera, por sí solas o en asociación, son capaces de generar gestaciones hipoxémicas a los 140 días, lo cual es indicativo de que en esos grupos, la etapa de crecimiento fetal acelerado se desarrolla en condiciones hipoxémicas.

Nuestros resultados difieren con los obtenidos por Rurak y Bassette (2013), quienes utilizando un esquema experimental similar, midieron las variables fetales en gestaciones ovinas de gestación única, mellicera y de trillizos a los 103 y 146 días de gestación. Sus hallazgos principales indican que a nivel general, mientras la gestación avanza, la PO_2 , SAT O_2 , pH, y contenido de O_2 disminuyen significativamente, mientras que se incrementa la PCO_2 y la concentración de Hb. Adicionalmente, identificaron un aumento significativo en los niveles de lactato cuando el contenido de O_2 cae bajo ~ 13 mmHg. Sin embargo, al evaluar el comportamiento de las variables de acuerdo a la cantidad de fetos, sólo los

trillizos fueron hipoxémicos, mientras que los de gestación única y mellicera no presentaron alteraciones en los parámetros de oxigenación. Estas diferencias con nuestros resultados podrían explicarse por los regímenes alimentarios de las ovejas, puesto que los investigadores no especificaron el plano nutricional de las madres durante el periodo de estudio. Siendo el esquema de alimentación más probable el de pastoreo (sin considerar las propiedades nutricionales del pasto empleado) ad-libitum durante toda la gestación. En consecuencia, cuando las ovejas son sometidas a subnutrición del ~70%NRC en etapas tempranas y medias de la gestación, se podrían desarrollar alteraciones placentarias que disminuirían la cantidad de O₂ disponible para los fetos en la gestación tardía.

La capacidad placentaria para la transferencia de nutrientes y oxígeno depende del adecuado desarrollo y crecimiento placentario. El desarrollo placentario y su consecuente capacidad para transferir nutrientes juega un rol clave en la trayectoria del crecimiento fetal, ya que permite desarrollar y/o expresar el potencial de crecimiento fetal en condiciones adecuadas (Bell *et al.*, 1999; Wallace *et al.*, 1999). Particularmente para la difusión transplacentaria de oxígeno, se ha descrito que es mínima durante la gestación temprana y media (Carter, 1989). Además, en la hembra ovina la difusión de oxígeno hacia el feto ocurre mediante difusión simple, la cual es dependiente de la proporción entre el flujo sanguíneo uterino-umbilical, así como de la capacidad materna y fetal para el transporte del oxígeno, determinado por la afinidad (materno-fetal) de hemoglobina por oxígeno y de la cantidad de oxígeno consumida por la placenta. De este modo, la subnutrición materna por sí sola afecta el desarrollo placentario que permitiría realizar un adecuado transporte de oxígeno, especialmente durante el último tercio de gestación.

La subnutrición materna durante el periodo peri-concepcional produce un menor desarrollo placentario al afectarse el anclaje entre los cotiledones fetales a las carúnculas maternas, disminuyendo la formación de placentomas (Clarke, 1998) o produciendo un desarrollo vascular placentario deficiente (Reynolds *et al.*, 2006). Consecuentemente, son afectados tanto la entrega de nutrientes como de oxígeno a la circulación fetal (Mancinelli *et al.*, 2007; Giussani *et al.*, 2007). Así, una placenta insuficiente originada por subnutrición materna disminuye la cantidad de nutrientes y oxígeno que reciben los fetos, produciéndoles restricción del crecimiento intrauterino, al ser afectados tanto por

subnutrición como por hipoxemia. En apoyo a la idea anterior, se ha demostrado que el crecimiento exponencial del feto durante la última mitad de la gestación depende principalmente de un correcto desarrollo vascular-útero-placentario (Reynolds y Redmer, 1995).

Por otra parte, es frecuente que las gestaciones múltiples se desarrollen bajo restricción de crecimiento intrauterino, ya que comparándolas con gestaciones individuales, los mellizos deben competir por nutrientes, oxígeno y espacio uterino (Freetly and Leymaster, 2004; Gootwine *et al.*, 2007). Para las gestaciones melliceras, además, la capacidad para obtener nutrientes y gases desde la circulación materna sería menor, al disponer individualmente de menor masa placentaria (Gootwine *et al.*, 2007; van der Linden *et al.*, 2014) y placentomas, a pesar de sus adaptaciones morfológicas y vasculares (Virrenga *et al.*, 2004; Vonnahme *et al.*, 2006).

Estos antecedentes son concordantes con resultados obtenidos en este estudio, ya que respecto a la placenta del grupo CU, las gestaciones melliceras presentaron mayor peso total de placenta por oveja, menor peso placentario por feto, mayor cantidad de placentomas por oveja y menor cantidad de placentomas por feto, resultados que, tomados en conjunto, permiten presumir que las placentas de ovejas melliceras tendrían una menor capacidad para transferir nutrientes y gases entre los compartimentos materno-fetal.

Considerando lo anteriormente expuesto, la hipoxemia presentada en la vena umbilical de fetos de ovejas melliceras a los 140 días de gestación puede atribuirse a insuficiencia placentaria producida por subnutrición materna, tanto en gestaciones únicas como en melliceras, lo cual sumado a la competencia fetal relativa de las gestaciones múltiples, resulta en un estado fetal más hipóxico que gestaciones con placentas suficientes.

Sin embargo, es importante destacar que a pesar de las condiciones hipoxémicas evidenciadas en los fetos RU, la hipoxemia por sí sola no afectó significativamente su desarrollo, ya que las adaptaciones placentarias y la movilización de reservas nutricionales maternas fueron suficientes para evitar efectos de mayor magnitud sobre el desarrollo fetal con IUGR.

Por otra parte, las gestaciones mellíceras presentaron placentas insuficientes y fueron desarrolladas en condiciones hipóxicas, lo cual sumado a la competencia fetal relativa, resultaron en IUGR, independientemente del plano nutricional de la madre. En este caso, la subnutrición materna crónica por sí sola y/o asociada a la competencia fetal relativa, característica de las gestaciones múltiples, se traduce en una menor disponibilidad de nutrientes y oxígeno para los fetos. Además, la condición hipóxica derivada de una placenta insuficiente, podría perjudicar por sí sola el desarrollo fetal mediante mecanismos, que si bien, no totalmente esclarecidos, asocian la hipoxia con una inhibición de la activación, tanto en el músculo fetal (Chaillou *et al.*, 2014), como en otros tejidos (Laplante y Sabatini, 2013) de *Mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR) una quinasa altamente conservada en que controla el crecimiento celular y el metabolismo en respuesta a nutrientes, factores de crecimiento, energía celular y estrés (Hall, 2008).

Una vía adicional que permitiría explicar el rol de la hipoxia en la inhibición del crecimiento fetal, es la alteración de la respiración celular que lleva al incremento de especies reactivas del O₂. Es ampliamente aceptado que la hipoxia incrementa la concentración intracelular del factor inducido por hipoxia-1 α (HIF-1 α). Papandreou *et al.*, (2006), proponen que si bien, HIF-1 α estimula la glicólisis, además reprime activamente la función mitocondrial y el consumo de oxígeno, induciendo la actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa-1 (PDK-1). Su activación disminuiría el consumo mitocondrial de oxígeno, al fosforilar e inhibir en la matriz mitocondrial a la enzima piruvato deshidrogenasa, evitando así que el piruvato se convierta en acetil-CoA e ingrese al ciclo de Krebs. Así, por un lado, aumentaría relativamente la disponibilidad de oxígeno celular, pero el piruvato se metabolizaría a lactato para ingresar a la vía anaeróbica, disminuyendo el pH y la eficiencia de conversión de glucosa en ATP, obteniendo menos ATP que mediante el ciclo de Krebs (Papandreou *et al.*, 2006). Además, se ha descrito que en células hipóxicas se modifica la actividad de la enzima citocromo C oxidasa (COX). COX es un dímero compuesto por monómeros de 13 subunidades, ubicado en la membrana mitocondrial interna que participa en la cadena transportadora de electrones (Tsukihara *et al.*, 1996). En condiciones de normoxia, cuando la proporción ATP/ADP es alta, COX4 se une al ATP produciendo la inhibición alostérica de COX (Napiwotzki y Kadenbach, 1998). Sin embargo, en condiciones hipóxicas HIF-1 α regula la expresión de la subunidad COX4

al estimular la transcripción de genes que codifican a COX4-2 y a LON, una proteasa mitocondrial requerida para la degradación de COX4-1. De esta forma, HIF1- α evita la inhibición de COX, permitiendo la producción de ATP en la cadena transportadora de electrones aun en rangos ATP/ADP altos (Fukuda *et al.*, 2007; Papandreou *et al.*, 2006). Sin embargo, mantener el metabolismo celular energético en esas condiciones podría llevar a un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS también activan la vía HIF en hipoxia, estabilizando las isoformas HIF- α . Los autores Hemant y Choi, (2015) concluyeron que se requiere mayor investigación para clarificar la formación paradójica de las ROS en respuesta a la hipoxia.

6.3 Relación entre hipoxia fetal y subnutrición materna, con restricción del crecimiento intrauterino.

El último tercio de gestación es un período crítico para el crecimiento fetal, debido a que en este período ocurre el ~90% de la ganancia de peso que tendrá el feto al momento de su nacimiento. Además, las demandas nutricionales fetales son las más altas y las deficiencias nutricionales maternas se pueden ver reflejadas en el feto (Igwebuike, 2010). En concordancia con nuestros resultados, Rumball *et al.*, (2008) ha establecido que la subnutrición materna tiene un impacto mayor en el crecimiento de mellizos que en fetos gestados individualmente. Sin embargo, el peso al nacimiento y desarrollo de las crías no se altera únicamente debido a la baja nutrición materna durante la gestación. Como puede observarse en nuestro estudio, las ovejas que sufren subnutrición durante la gestación, experimentan pérdida en la condición corporal, debido a la movilización de sus propias reservas de lípidos durante el último tercio de gestación. De este modo, las madres compensan al menos parcialmente, el déficit entre los nutrientes obtenidos por la dieta y las exigencias feto-placentarias (Osgerby *et al.*, 2002).

Diversos estudios han reportado que, independiente de las reducciones en la entrega de nutrientes, la hipoxia por sí sola perjudica el crecimiento fetal (Giussani *et al.*, 2001; Soria *et al.*, 2013). Esto se ha podido evidenciar en estudios realizados por Parraguez *et al.*, (2005), en que la exposición de ovejas gestantes a hipoxia crónica origina restricción del crecimiento intrauterino y consecuentemente, bajos pesos al nacimiento. Además, se señala

que dicha restricción del crecimiento fetal está asociada con un desarrollo placentario inapropiado (Parraguez *et al.*, 2006).

La placenta por su parte, no es simplemente un transportador pasivo de nutrientes y hormonas fetales, sino que es un órgano metabólicamente activo que utiliza nutrientes y oxígeno para su crecimiento, en proporciones similares a las que consume el feto (Brett, *et al.*, 2014). Existe un equilibrio complejo entre la utilización de sustratos nutricionales y oxígeno por parte de la placenta, con la transferencia de nutrientes al feto para propiciar su desarrollo (Burton *et al.*, 2016).

La capacidad placentaria para la transferencia de nutrientes depende de su adecuado desarrollo y crecimiento. La suficiencia placentaria juega un rol clave en la trayectoria del crecimiento fetal, ya que permite desarrollar y/o expresar el potencial de crecimiento fetal en condiciones adecuadas (Bell *et al.*, 1999; Wallace *et al.*, 1999). Por su parte, el crecimiento fetal depende del suministro materno-placentario de oxígeno y nutrientes, los cuales son proporcionados respectivamente a través de dos procesos, difusión simple y transferencia mediada por transportadores (Sibley *et al.*, 1997). Los nutrientes fetales principales son la glucosa (junto a su derivado metabólico, el lactato) y los aminoácidos (Hay Jr *et al.*, 1985; Regnault *et al.*, 2002). La capacidad de transporte de nutrientes varía en función del tamaño placentario, formación y estructura vascular, flujo sanguíneo, permeabilidad placentaria, abundancia de transportadores y, en algunos casos, gradiente de concentración (Fowden *et al.*, 2006).

En el modelo de detección placentaria de nutrientes propuesto por Jansson y Powell, (2013), se sugiere que en las células del trofoblasto, mTOR funcionaría como un integrador de señales entre el suministro de nutrientes materno y de la demanda fetal. La vía mTOR integra diversas señales que regulan el crecimiento fetal, incluyendo factores de crecimiento, estrés, estatus energético, nivel de oxígeno y disponibilidad de aminoácidos (Roos *et al.*, 2009; Laplante y Sabatini 2013).

La vía de señalización mTOR recibe señales maternas (ej: insulina, leptina) en las microvellosidades de la membrana plasmática en el sinciotrofoblasto, y luego transmite esta información río abajo (downstream en inglés) para modificar la transcripción génica y

consecuentemente la traducción proteica, regulando así, el aumento o disminución de las proteínas transportadoras para los nutrientes involucrados en el crecimiento embrio-fetal. (Brett, *et al.*, 2014).

Desde una perspectiva adaptativa, se ha observado que durante la gestación temprana y media, las hembras gestantes presentan una mayor ingesta de alimento. En este caso, se ha asociado la estimulación del apetito con los niveles de progesterona. Esto permitiría el depósito de reservas energéticas adiposas para ser utilizadas durante la gestación avanzada y/o lactancia (Newbern y Freemark, 2011). Estudios señalan que esa acumulación energética es facilitada por la resistencia a la leptina (Ladyman *et al.*, 2010), ya que estaría previniendo la retroalimentación negativa que se ejerce desde los centros hipotalámicos del apetito cuando sus niveles son altos. Además, se ha observado un incremento del 60% en la secreción de insulina, aumentando la lipogénesis y disminuyendo la oxidación de ácidos grasos, contribuyendo así a la acumulación de tejido adiposo (Newbern y Freemark, 2011).

Se describe que la gestación representa un estado natural de resistencia a la insulina, lo cual sería concordante con observaciones que indican que la entrega de micronutrientes en la vena umbilical depende de la diferencia de concentraciones de glucosa entre la madre y el feto, la cual aumenta con el avance de la gestación (Marconi *et al.*, 1996). Además, estudios indican que durante la segunda mitad de la gestación aumenta la gluconeogénesis hepática (utilizando glucógeno), y disminuyen la captación (celular) de glucosa, el almacenamiento de energía en el músculo esquelético (glucógeno) y tejido adiposo (triglicéridos) maternos. En este período, también aumenta la lipólisis del tejido adiposo, permitiendo que la glucosa y lípidos maternos estén biodisponibles para su transferencia al feto (Myatt, 1992; Newbern y Freemark, 2011).

Pese a que son muchos los factores que contribuyen a la presentación de resistencia a la insulina durante la gestación, se piensa que la hormona del crecimiento placentaria (pGH), una variante de la hormona del crecimiento, desempeña un papel importante (Kirwan *et al.*, 2002; Mastorakos y Ilias., 2003; Catalano *et al.*, 2006), puesto que se ha evidenciado que es

un potente antagonista de insulina, por estimular la lipólisis materna (Barbour *et al.*, 2002; 2004) y la gluconeogénesis hepática (Lacroix *et al.*, 2002).

Recientemente se ha evidenciado que la adiponectina materna funciona como un vínculo endocrino entre los depósitos de grasa maternos, la función placentaria y el crecimiento fetal (Aye *et al.*, 2013). Se ha reportado en la literatura que los niveles séricos de adiponectina materna están inversamente correlacionados con el peso al nacimiento en mujeres embarazadas sanas con variaciones en el índice de masa corporal durante la gestación temprana (Jansson *et al.*, 2008; Lowe *et al.*, 2010). Específicamente, la adiponectina materna inhibe la señal placentaria de insulina mediada por la generación de ceramidas, lo cual resulta en la inhibición de la vía mTOR, disminuyendo así la disponibilidad de aminoácidos y consecuentemente, limitando el crecimiento fetal.

De acuerdo con esto, las adaptaciones metabólicas maternas estarían orientadas a acumular tejido adiposo durante la gestación temprana, mientras que, dependiendo del estado nutricional de la madre, en la gestación tardía se promueve la entrega de nutrientes al feto. A nivel placentario, la inhibición de la vía mTOR frente el exceso de nutrientes podría ser una respuesta de retroalimentación negativa (Wullschleger *et al.*, 2006), para así restringir el influjo excesivo de nutrientes hacia el feto y la restricción de nutrientes activaría la vía mTOR, propiciando su entrega (Roos *et al.*, 2007; Yung *et al.*, 2008; Kavitha *et al.*, 2014). Dichas observaciones serían consistentes con las variaciones en la condición corporal en las ovejas y los parámetros de crecimiento fetal evaluados en este estudio.

6.3.1 Relación entre hipoxia e IUGR.

Está demostrado que los reguladores positivos de mTOR incluyen las hormonas maternas insulina, leptina e IGF-1 (Jansson *et al.*, 2003; Roos *et al.*, 2009; Von Versen-Hoynck *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2010), mientras que la adiponectina y la hipoxia inhiben mTOR (Nelson *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2010; Rosario *et al.*, 2012). Cuando la disponibilidad de nutrientes maternos se encuentra restringida, la actividad de mTOR placentario disminuye. Esto ha sido demostrado en estudios de IUGR en humanos (Roos *et al.*, 2007; Yung *et al.*, 2008), restricción proteica en ratas (Jansson *et al.*, 2006; Rosario *et al.*, 2011) y babuinos con restricción nutricional materna (Kavitha *et al.*, 2014), lo cual indicaría que la

subnutrición materna puede afectar el suministro de nutrientes, al regular la entrega placentaria, además de la disminución nutricional propia de la carencia nutricional. De este modo, ambos factores (subnutrición e hipoxemia) modularían conjuntamente el crecimiento fetal. Diversos autores han evaluado a los transportadores de aminoácidos placentarios en gestaciones sometidas a IUGR (Sibley *et al.*, 2005; Jansson y Powell, 2006; Sibley 2009). En dichas investigaciones se ha reconocido consistentemente que su expresión y actividad en gestaciones IUGR están disminuidas, lo cual estaría relacionado con la disminución significativa en la concentración de aminoácidos en el cordón umbilical de gestaciones con IUGR, al compararlo con gestaciones normales (Cetin *et al.*, 1992).

Estas dos observaciones: 1) la disminución de la actividad de mTOR placentaria en gestaciones llevadas a cabo bajo subnutrición materna y 2) la disminución de la actividad de transportadores de amino ácidos placentarios (independiente de su expresión) en gestaciones sometidas a IUGR, podrían ser parte de una estrategia adaptativa placentaria en la cual, la placenta, en respuesta a un ambiente subóptimo, intenta regular el crecimiento fetal sin comprometer el desarrollo de órganos vitales, como cerebro y corazón (Brett *et al.*, 2014). En consecuencia, la disminución en la capacidad y eficiencia de los transportadores de aminoácidos podría ser un factor importante en las gestaciones que se cursan con IUGR. En vista de lo anterior, se propone que la disminución en la actividad de la vía de señalización mTOR y transporte de nutrientes en respuesta a la restricción nutricional materna, sugieren que la placenta haría coincidir el crecimiento fetal (limitándolo o promoviéndolo) con la disponibilidad de nutrientes en la interfase materno-placentario-fetal (Brett *et al.*, 2014).

A nivel fetal, el músculo fetal ovino representa entre el 20% y el 30% de su masa corporal al nacimiento (Forhead *et al.*, 2002). Los componentes principales de los músculos son sus fibras, siendo su número y tamaño las características determinantes de la masa muscular ovina al nacimiento. El número de fibras musculares se establece durante la fase embrionaria (Ashmore *et al.*, 1972; Wilson *et al.*, 1992). En los fetos ovinos, la mayoría de la diferenciación muscular concluye alrededor del día 85 de gestación (Fahey *et al.*, 2005). Una vez completada la miogénesis, el crecimiento muscular ocurriría por hipertrofia de las fibras (ya diferenciadas), la cual es dependiente del número total de fibras (Rehfeldt *et al.*, 2000).

El músculo esquelético tiene una menor prioridad en la asignación de nutrientes durante el desarrollo fetal al compararse con otros tejidos como el cerebro, corazón o hígado. Es por esta razón, que el músculo es más sensible a la deficiencia nutricional (Zhu *et al.*, 2006). El efecto producido en el crecimiento fetal y muscular por la nutrición materna restringida depende del grado y del momento de la gestación en que ocurre (Fahey *et al.*, 2005). La insuficiencia placentaria inducida por competencia relativa en mellizos durante la gestación tardía (sobre los 100 días), puede reducir el peso muscular (Fahey *et al.*, 2005; Sales *et al.*, 2013). Además, está asociada con una menor síntesis proteica muscular (McCoard *et al.*, 2001).

En gestaciones donde los fetos fueron expuestos a ambientes intrauterinos hipóxicos, se observó una reducción en la masa muscular, junto a la disminución en el peso al nacimiento, en comparación a crías con pesos al nacimiento normales (Jensen *et al.*, 2008). Experimentos realizados en ratas, mostraron una regeneración muscular alterada, debido a la menor actividad de la vía mTOR (Chaillou *et al.*, 2014), lo cual sugiere que restricción del crecimiento intrauterina evidenciada en gestaciones melliceras y/o bajo subnutrición materna, es influida por la hipoxia a través de la vía mTOR.

Desde una perspectiva bioenergética, AMPK es el sensor global de energía celular (Inoki *et al.*, 2012). Cuando suben los niveles de AMP (lo cual es señal de depleción de ATP), AMPK mantiene el balance de la energía celular al cambiar las vías anabólicas que utilizan ATP (incluyendo la síntesis proteica), por vías catabólicas que generan ATP, como el aumento en la captación de glucosa o la oxidación de ácidos grasos (Zorzano, 2008). Cuando bajan los niveles de ATP o en condiciones hipóxicas, AMPK fosforila TSC2 e incrementa su actividad GAP hacia Rheb, inhibiendo la actividad de mTOR, específicamente su subunidad mTORC1 (Inoki *et al.*, 2003). Además, AMPK se comunica directamente con mTORC1, generando una inhibición alostérica de mTORC1 al fosforilar Raptor (Gwinn *et al.*, 2008).

Diversos estudios han demostrado como mTORC1 incrementa la traducción de proteínas (Richter y Sonenberg, 2005; Jacinto *et al.*, 2006; Ma y Blenis, 2009; Laplante y Sabatini, 2009) y que la vía de señalización mTORC1 es inhibida por la hipoxia (Wouters *et al.*,

2008; Cam *et al.*, 2010) y por la disponibilidad de aminoácidos (Smith *et al.*, 2005; Guertin y Sabatini, 2007). Adicionalmente, la hipoxia afecta a mTORC1 en una vía independiente de AMPK, al inducir la expresión de REDD1, otro inhibidor de mTORC1 (Brugarolas *et al.*, 2004).

Por otra parte, el factor insulínico de crecimiento I (IGF-I) es un regulador clave en el crecimiento fetal que influye en el tamaño y el peso al nacimiento. Además, influye en el peso de órganos fetales como bazo, pulmones, corazón, glándula pituitaria, glándula adrenal, hígado y músculo esquelético (Igwebuike, 2016). La proteína ligante de IGF-I (IGFBP-I) es el principal regulador de la biodisponibilidad fetal de IGF-I (Lee *et al.*, 1997). Algunos autores proponen que el aumento en IGFBP-1 sería un mecanismo importante en la restricción del crecimiento en modelos humanos de IUGR y de animales sometidos a hipoxia crónica intrauterina (Giudice *et al.*, 1997; Ingec *et al.*, 2004; Kajimura *et al.*, 2005). Se ha evidenciado que la hipoxia regula positivamente la expresión del mRNA IGFBP-I y su expresión proteica, tanto *in vitro* (Tazuke *et al.*, 1998; Seferovic *et al.*, 2008) como *in vivo* (Kajimura *et al.*, 2005).

La fosforilación de IGFBP-1 aumenta su afinidad por IGF-1 y la hipoxia induce la hiperfosforilación de IGFBP-1, disminuyendo la biodisponibilidad de IGF-I (Tazuke *et al.*, 1998). Se ha evidenciado presencia de inhibición de la vía de señalización mTOR, junto a la hiperfosforilación de IGFBP-1 en el hígado fetal de babuinos con IUGR (Shehab *et al.*, 2014). No obstante, el mecanismo molecular que vincula la hipoxia con la fosforilación aumentada de IGFBP-I es desconocido.

Por lo tanto, la inhibición de la vía mTOR, mediante la inactivación de mTORC1, podría ser un mecanismo que vincule la hipoxia y/o la subnutrición materna con la IUGR, en el tercer tercio de gestación, al disminuir la hipertrofia muscular. De este modo, la disminución en la biodisponibilidad de IGF-1 por la hiperfosforilación de IGFBP-1 en condiciones hipóxicas, podría ser un mecanismo que vincule directamente la hipoxia con la IUGR. Consistente con lo anterior, algunos autores proponen que la disminución en la biodisponibilidad fetal de IGF-1 serviría como un mecanismo adaptativo importante para restringir su crecimiento en condiciones desfavorables, priorizando la sobrevivencia materno-fetal a expensas del crecimiento fetal, aunque paradójicamente, se sabe que

mTORC1 promueve la expresión del factor inducible por hipoxia 1- α (HIF-1 α), el cual activa la transcripción de diversos genes en respuesta a la hipoxia (Düvel *et al.*, 2010), incluyendo IGFBP-1 (Tazuke *et al.*, 1998).

7. CONCLUSION

En ovejas, tanto la condición de mellicera, como la restricción nutricional durante la gestación, por sí solas o en asociación, son factores que llevan al desarrollo de restricción del crecimiento fetal intrauterino. Esta condición se asocia a hipoxemia posiblemente derivada del menor desarrollo placentario como consecuencia de la subnutrición, lo que en el caso de las preñeces melliceras se acentúa por una mayor demanda de oxígeno para satisfacer las demandas de los dos fetos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **ARNOLD, D.; SCHEAFER, A.; REDMER, D.; CATON, J.; REYNOLDS, L.** (2001). Effect of nutrient restriction on placental vascularity and fetal growth in sheep. *Biol. Reprod.* 64: 352-365.
- **ASHMORE, C.; ROBINSON, D.; RATTRAY, P.; DOERR, L.** (1972). Biphasic development of muscle fibers in the fetal lamb. *Exp. Neurol.* 37(2): 241-255.
- **AYE, I.; POWELL, T.; JANSSON, T.** (2013). Review: Adiponectin—the missing link between maternal adiposity, placental transport and fetal growth? *Placenta* 34: 40 -45.
- **BARBOUR, L.; SHAO, J.; QIAO, L.; PULAWA, L.; JENSEN, D.; BARTKE, A.; GARRITY, M.; DRAZNIN, B.; FRIEDMAN, J.** (2002). Human placental growth hormone causes severe insulin resistance in transgenic mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 186(3): 512–517.
- **BARBOUR, L.; SHAO, J.; QIAO, L.; LEITNER, W.; ANDERSON, M.; FRIEDMAN, J.; DRAZNIN, B.** (2004). Human placental growth hormone increases expression of the p85 regulatory unit of phosphatidylinositol 3-kinase and triggers severe insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology* 145(3):1144–1150.
- **BELL, A.; HAY JR, W.; EHRHARDT, R.** (1999). Placental transport of nutrients and its implications for fetal growth. *J. Reprod. Fert.* 54: 401-10.
- **BRETT, K.; FERRARO, Z.; YOCKELL-LELIEVRE, J.; GRUSLIN, A.; ADAMO, K.** (2014). Maternal–Fetal Nutrient Transport in Pregnancy Pathologies: The Role of the Placenta. *Int. J. Mol. Sci.* 15(9):16153-16185.
- **BRUGAROLAS, J.; LEI, K.; HURLEY, R.; MANNING, B.; REILING, J.; HAFEN, E.; WITTERS, L.; ELLISEN, L.; KAELIN, W.** (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* 18(23):2893–904.
- **BURTON, G.; WOODS, A.; JAUNIAUX, E.; KINGDOM, J.** (2009). Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta* 30(6): 473-482.
- **BURTON, G.; FOWDEN, A.; THORNBURG, K.** (2016). Placental origins of chronic disease. *Physiol. Rev.* 96(4): 1509-1565.
- **CAM, H.; EASTON, J.; HIGH, A.; HOUGHTON, P.** (2010). mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1 α . *Mol. Cell.* 40(4): 509–520.

- **CATALANO, P.; HOEGH, M.; MINIUM, J.; HUSTON-PRESLEY, L.; BERNARD, S.; KALHAN, S.; HAUGUEL-DE MOUZON, S.** (2006). Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetology* 49(7):1677–1685.
- **CARTER, A.** (1989). Factors affecting gas transfer across the placenta and the oxygen supply to the fetus. *J. Dev. Physiol.* 12(6): 305–22.
- **CETIN, I.; MARCONI, A.; CORBETTA, C.; LANFRANCHI, A.; BAGGIANI, A.; BATTAGLIA, F.; PARDI, G.** (1992). Fetal amino acids in normal pregnancies and in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. *Early Hum. Dev.* 29(1): 183–186.
- **CHADDHA, V.; VIERO, S.; HUPPERTZ, B.; KINGDOM, J.** (2004). Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. *Semin. fetal neonatal med.* 9(5): 357-369.
- **CHAILLOU, T.; KOULMANN, N.; MEUNIER, A.; PUGNIERE, P.; MCCARTHY, J.; BEAUNDRY, M.; BIGARD, X.** (2014). Ambient hypoxia enhances the loss of muscle mass after extensive injury. *Eur. J. Physiol.* 466(3):587-598.
- **CLARO, D.** (1978). Reproducción de los ovinos en Magallanes. *Agric. Tec.* 38: 73-77.
- **CLARKE, L.; HEASMAN, L.; JUNIPER, D.; SYONDS, E.** (1998). Maternal nutrition in early-mid gestation and placental size in sheep. *British J. Nutr.* 79(4): 359-364.
- **COWDEN DAHL, K.; FRUER, B.; MACK, F.; COMPERNOLLE, V.; MALTEPE, E.; ADELMAN, D.; SIMON, M.** (2005). Hypoxia-inducible factors I alpha and 2 alpha regulate trophoblast differentiation. *Mol. cell boil.* 25(23): 10479-10491.
- **DUNLAP, K.; BROWN, J.; KEITH, A.; SATTERFIELD, M.** (2015). Factors controlling nutrient availability to the developing fetus in ruminants. *J. Anim. Sci. Biotech.* 6(1): 1-10.
- **DÜVEL, K.; YECIES, J.; MENON, S.; RAMAN, P.; LIPOVSKY, A.; SOUZA, A.; TRIANTAFELLOW, E.; MA, QICHENG; GORSKI, R.; CLEAVER, S.; HEIDEN, M.; KEIGAN, J.; FINAN, P.; CLISH, C.; MURPHY, C.; MANNING, B.** (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell.* 39(2):171–183.
- **FAHEY, A.J.; BRAMELD, J.M., PARR, T., BUTTERY, P.J.** (2005). Ontogeny of factors associated with proliferation and differentiation of muscle in the ovine fetus. *J. Anim. Sci.* 83(10): 2330-2338.
- **FREETLY, H.; LEYMASTER, K.** (2004). Relationship between litter birth weight and litter size in six breeds of sheep. *J. Anim. Sci.* 82(2): 612-618.
- **FREITAS DE MELO, A.; UNGERFELD, R.; HÖTZEL, M.J.; ABUD, M.J.; ALVAREZ-OXILEY, A.; ORIHUELA, A.; DAMIÁN, J.P.; PÉREZCLARIGET, R.** (2015). Mother-

- young behaviours at lambing in grazing ewes: Effect of lamb sex and food restriction in pregnancy. *App. Anim. Behav. Sci.* 168: 31-36.
- **FORHEAD, A.; LI, J.; GILMOUR, R.; DAUNCEY, M.; FOWDEN, A.** (2002). Thyroid hormones and the mRNA of the GH receptor and IGFs in skeletal muscle of fetal sheep. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282(1): 80-86.
 - **FOWDEN, A.; RALPH, M.; SILVER, M.** (1994). Nutritional regulation of uteroplacental prostaglandin production and metabolism in pregnant ewes and mares during late gestation. *Exp. Clin. Endocrinol.* 103(3): 212-221.
 - **FOWDEN, A.; WARD, J.; WOODING, F.; FORHEAD, A.; CONSTANCIA, M.** (2006). Programming placental nutrient transport capacity. *J. Physiol.* 572(1): 5–15.
 - **FUKUDA, R.; ZHANG, H.; KIM, J.; SHIMODA, L.; DANG, C.; SEMENZA, G.** (2007). HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell.* 29(1): 111-122.
 - **GIUDICE, L.; MARTINA, N.; CRYSTAL, R.; TAZUKE, S.; DRUZIN, M.** (1997). Insulin-like growth factor binding protein-1 at the maternal-fetal interface and insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in the circulation of women with severe preeclampsia. *Am. J. Obstet Gynecol.* 176:751–757.
 - **GIUSSANI, D.; PHILLIPS, P.; ANSTEE, S.; BARKER, J.** (2001). Effects of altitude versus economic status on birth weight and body shape at birth. *Pediatr. Res.* 49(4): 490-494.
 - **GIUSSANI, D.; SALINAS, C; VILLENA, M.; BLANCO, C.** (2007). The role of oxygen in prenatal growth: Studies in the chick embryo. *J. Physiol.* 585(3): 911–917.
 - **GOOTWINE, E.** (2005). High variability in the rate of decline in birth weight as litter size increases in sheep. *J. Anim. Sci.* 81(3): 393-398.
 - **GOOTWINE, E.; SPENCER, T.; BAZER, F.** (2007). Litter-size-dependent intrauterine growth restriction in sheep. *Animal* 1(4): 547-564.
 - **GREENWOOD, P.; SLEPETIS, R.; BELL, A.** (2000). Influences on fetal and placental weights during mid to late gestation in prolific ewes well nourished throughout pregnancy. *Reprod. Fert. Dev.* 12(4): 149-156.
 - **GUERTIN DA, SABATINI DM.** (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell.* 12(1): 9–22.
 - **GWINN, D.; SHACKELFORD, D.; EGAN, D.; MIHAYLOVA, M.; MERY, A.; VASQUEZ, D.; TURK, B.; SHAW, R.** (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. cell.* 30(2): 214-226.
 - **HALL, M.** (2008). mTOR—What Does It Do? Elsevier. *Transp. Proceed.* 40: S5-S8

- **HAY JR, W.; SPARKS, J.** (1985). Placental, fetal, and neonatal carbohydrate metabolism. *Clin. Obstet. Gynecol.* 28: 473–85.
- **IBM CORP.** (2013). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- **IGWEBUIKE, U.** (2010). Impact of maternal nutrition on ovine foetoplacental development: A review of the role of insulin-like growth factors. *Anim. Reprod. Sci.* 121(3-4): 189-196.
- **INGEC, M.; GURSOY, H.; YILDIZ, L.; KUMTEPE, Y.; KADANALI, S.** (2004). Serum levels of insulin, IGF-I, and IGFBP-1 in pre-eclampsia and eclampsia. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 84(3): 214–219
- **INOKI, K.; ZHU, T.; GUAN, K.** (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell.* 115(5): 577-590
- **INOKI, K.; KIM, J.; GUAN, K.** (2012). AMPK and mTOR in Cellular Energy Homeostasis and Drug Targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52: 381–400.
- **JACINTO, E.; FACCHINETTI, V.; LIU, D.; SOTO, N.; WEI, S.; YUN JUNG, S.; HUANG, Q.; QIN, J.; SU, B.** (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell.* 127(1):125–137.
- **JANSSON, N.; GREENWOOD, S.; JOHANSSON, B.; POWELL, T.; JANSSON, T.** (2003). Leptin stimulates the activity of the system A amino acid transporter in human placental villous fragments. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88(3): 1205–1211.
- **JANSSON, N.; NILSFELT, A.; GELLERSTEDT, M.; WENNERGREN, M.; ROSSANDER-HULTHEN, L.; POWELL, T.; JANSSON, T.** (2008). Maternal hormones linking maternal body mass index and dietary intake to birth weight. *Am. J. Clin. Nutr.* 87(6):1743–1749.
- **JANSSON, N.; PETTERSSON, J.; HAAFIZ, A.; ERICSSON, A.; PALMBERG, I.; TRANBERG, M.; GANAPATHY, V.; POWELL, T.; JANSSON, T.** (2006). Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet. *J. Physiol.* 576(3): 935–946.
- **JANSSON, T.; POWELL, T.** (2006). Human placental transport in altered fetal growth: Does the placenta function as a nutrient sensor? —A review. *Placenta* 27: 91–97.
- **JANSSON, T.; AYE, I.; GOBERDHAN, D.** (2012). The emerging role of mTORC1 signaling in placental nutrient-sensing. *Placenta* 33: e23-e29.
- **JANSSON, T.; POWELL, T.** (2013). Role of placental nutrient sensing in developmental programming. *Clin. Obstet. Gynecol.* 56(3): 591–601.
- **JEFFERIES, B.** (1961). Body condition scoring and its use in management. *Tas. J. Agric.* 32: 19-21.

- **JENSEN, C.; MARTIN-GRONERT, M.; STORGAARD, H.; MADSBAD, S.; VAAG, A.; OZANNE, S.** (2008). Altered pi3-kinase/akt signalling in skeletal muscle of young men with low birth weight. *PLoS One* 3(11): 3738.
- **JONES, H.; JANSSON, T.; POWELL, T.** (2010). Full-length adiponectin attenuates insulin signaling and inhibits insulin-stimulated amino acid transport in human primary trophoblast cells. *Diabetes* 59(5): 1161–1170.
- **KAJIMURA, S.; AIDA, K.; DUAN, C.** (2005). Insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) mediates hypoxia-induced embryonic growth and developmental retardation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(4):1240–1245
- **KALLIO, P.; OKAMOTO, K.; O´ BRIEN, S.** (1998). Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor 1alpha. *The EMBO J.* 17(22): 6573-6586.
- **KAVITHA, J.; ROSARIO, F.; NIJLAND, M.; MCDONALD, T.; WU, G.; KANAI, Y.; POWELL, T.; NATHANIELSZ, P.; JANSSON, T.** (2014). Down-regulation of placental mTOR, insulin/IGF-I signaling, and nutrient transporters in response to maternal nutrient restriction in the baboon. *FASEB J.* 28(3): 1294–1305.
- **KIRWAN, J.; HAUGUEL-DE MOUZON, S.; LEPERCQ, J.; CHALLIER, J.; HUSTON-PRESLEY, L.; FRIEDMAN, J.; KALHAN, S.; CATALANO P.** (2002). TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes.* 51(7): 2207–2213.
- **KUMAR, H.; CHOI, D.** (2015). Hypoxia inducible factor pathway and physiological adaptation: a cell survival pathway?. *Med. Inflamm.* 2015:1-11.
- **LACROIX, M.; GUIBOURDENCHE, J.; FRENDO, J.; MULLER, F.; EVAIN-BRION, D.** (2002). Human placental growth hormone—a review. *Placenta* 23: 87-94.
- **LADYMAN, S.; AUGUSTINE, R.; GRATTAN D.** (2010). Hormone interactions regulating energy balance during pregnancy. *J. Neuroendocrinol.* 22(7): 805–817
- **LAPLANTE, M.; SABATINI, D.** (2009). mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 122(20):3589–3594.
- **LAPLANTE, M.; SABATINI, D.** (2013). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149(2): 274–293.
- **LEE, P.; GIUDICE, L.; CONOVER, C.; POWELL, D.** (1997). Insulin-like growth factor binding protein-1: recent findings and new directions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 216(3): 319–357.
- **LOWE, L.; METZGER, B.; LOWE JR, W.; DYER, A.; MCDADE, T.; MCINTYRE, H.; HAPO STUDY COOPERATIVE RESEARCH GROUP.** (2010). Inflammatory mediators

and glucose in pregnancy: results from a subset of the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95(12): 5427–5434.

- **MANCINELLI, R.; BINETTI, R.; CECCANTI, M.** (2007). Woman, alcohol and environment: emerging risks for health. *Neurosci. Bio. Behav. Rev.* 31(2): 246-253.
- **MARCONI, A.; PAOLINI, C.; BUSCAGLIA, M.; ZERBE, G.; BATTAGLIA, F.; PARDI, G.** (1996). The impact of gestational age and fetal growth on the maternal–fetal glucose concentration difference. *Obstet. Gynecol.* 87(6): 937–942.
- **MASTORAKOS, G.; ILIAS, I.** (2003). Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 997(1): 136–149.
- **MA, X.; BLENIS, J.** (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10(5):307–318.
- **MCCOARD, S.; PETERSON, S.; MCNABB, W.; HARRIS, P.; MCCUTCHEON, S.** (1997). Maternal constraint influences muscle fiber development in fetal lambs. *Reprod. Fert. Dev.* 9(7): 675-681.
- **MCCOARD, S.; MCNABB, W.; BIRTLES, M.; HARRIS, P.; MCCUTCHEON, S.; PETERSON, S.** (2001). Immunohistochemical detection of myogenic cells in muscles of fetal and neonatal lambs. *Cell. Tis. Org.* 169(1):21-33.
- **MYATT, L.** (1992). Control of vascular resistance in the human placenta. *Placenta* 13(4): 329–341.
- **NAPIWOTZKI, J.; KADENBACH, B.** (1998). Extramitochondrial ATP/ADP-ratios regulate cytochrome c oxidase activity via binding to the cytosolic domain of subunit IV. *Biol. Chem. V* 379(3): 335-339.
- **NATIONAL RESEARCH COUNCIL.** (1985). Nutrient requirements of sheep. 6th ed. National Academy Press, Washington, D.C. 120 p.
- **NELSON, D.; SMITH, S.; FURESZ, T.; SADOVSKY, Y.; GANAPATHY, V.; PARVIN, C.; SMITH, C.** (2003). Hypoxia reduces expression and function of system A amino acid transporters in cultured term human trophoblasts. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 284(2): 310–315.
- **NEWBERN, D.; FREEMARK, M.** (2011). Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. *Curr. Opin. Endocrinol. Diab. Obes.* 18(6): 409–416.
- **OSGERBY, C.; WATHES, D.; HOWARD, D.** (2002). The effect of maternal undernutrition on ovine fetal growth. *J. Endocrinol.* 173(1): 131-141.
- **PAPANDREOU, I.; CAIRNS, R.; FONTANA, L.; LIM, L.; DENKO, C.** (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell. Metab.* 3(3): 187-197.

- **PARRAGUEZ, V.; ATLAGICH, M.; DÍAZ, R.; BRUZZONE, M.; BEHN, C.; RAGGI, L.** (2005). Effect of hypobaric hypoxia on lamb intrauterine growth: comparison between high- and low-altitude native ewes. *Reprod. Fertil. Dev.* 17(5):497-505.
- **PARRAGUEZ, V.; ATLAGICH, M.; DÍAZ, R.; CEPEDA, R.; GONZÁLEZ, C.; DE LOS REYES, M.; BRUZZONE, M.; BEHN, C.; RAGGI L.A.** (2006). Ovine placenta at high altitudes: comparison of animals with different times of adaptation to hypoxic environment. *Anim. Reprod. Sci.* 95(1-2):151-157.
- **PRINGLE, K.; KIND, K.; SFERRUZZI-PERRI, A.; THOMPSON, J.; ROBERTS, C.** (2010). Beyond oxygen: complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy. *Hum. Reprod. Up.* 16(4): 415-431.
- **PUGH, C.; O'ROURKE, J.; NAGAO, M.; GLEADLE, M.; RATCLIFFE, P.** (1997). Activation of hypoxia-inducible factor 1; definition of regulatory domains within the α subunit. *J. boil. Chem.* 272(17):11205-11214.
- **REHFELDT, C., FIEDLER, I., DIETL, G., ENDER, K.** (2000). Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. *Lives. Prod. Sci.* 66(2): 177-188.
- **REGNAULT, T.; DE VRIJER, B.; BATTAGLIA, F.** (2002) Transport and metabolism of amino acids in placenta. *Endocrine* 19(1): 23–41.
- **REYNOLDS, L.; REDMER, D.** (1995). Utero-placental vascular development and placental function. *J. Anim. Sci.* 73(6): 1839-1851.
- **REYNOLDS, L.; BOROWICZ, P.; VONNAHME, K.; JOHNSON, M.; GRAZUL-BILSKA, A.; REDMER, D.; CATON, J.** (2005). Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. *J. Physiol.* 565(1): 43-58.
- **REYNOLDS, L.; CATON, J.; REDMER, D.; GRAZUL-BILSKA, A.; VONNAHME, K.; BOROWICZ, P.; LUTHER, J.; WALLACE, J.; WU, G.; SPENCER, T.** (2006). Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J. Physiol.* 572(1): 51-58.
- **RICHTER, J.; SONENBERG, N.** (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433(7025): 477–480.
- **RICHTER, H.; HANSELL, J.; RAUT.; GIUSSANI, D.** (2009). Melatonin improves placental efficiency and birth weight and increases the placental expression of antioxidant enzymes in undernourished pregnancy. *J. Pineal. Res.* 46(4): 357-364.
- **ROOS, S.; JANSSON, N.; PALMBERG, I.; SALJO, K.; POWELL, T.L.; JANSSON, T.** (2007). Mammalian target of rapamycin in the human placenta regulates leucine transport and is down-regulated in restricted fetal growth. *J. Physiol.* 582(1): 449–459.

- **ROOS, S.; LAGERLOF, O.; WENNERGREN, M.; POWELL, T.; JANSSON, T.** (2009). Regulation of amino acid transporters by glucose and growth factors in cultured primary human trophoblast cells is mediated by mTOR signaling. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 297(3): 723–731.
- **ROSARIO, F.; JANSSON, N.; KANAI, Y.; PRASAD, P.; POWELL, T.; JANSSON, T.** (2011). Maternal protein restriction in the rat inhibits placental insulin, mTOR, and STAT3 signaling and down-regulates placental amino acid transporters. *Endocrinology* 152(3): 1119–1129.
- **ROSARIO, F.J.; SCHUMACHER, M.A.; JIANG, J.; KANAI, Y.; POWELL, T.L.; JANSSON, T.** (2012). Chronic maternal infusion of full-length adiponectin in pregnant mice down-regulates placental amino acid transporter activity and expression and decreases fetal growth. *J. Physiol.* 590(6): 1495–1509.
- **ROOS, S.; POWELL, T.; JANSSON, T.** (2009). Placental mTOR links maternal nutrient availability to fetal growth. *Biochem. Soc. Trans.* 37: 295–298.
- **RURAK, D.; BASSETTE, N.** (2013). Changes in fetal lamb arterial blood gas and acid-base status with advancing gestation. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 304: R908-R9016.
- **RUMBALL, C.; HARDING, J.; OLIVER, M.; BLOOMFIELD, F.** (2008). Effects of twin pregnancy and periconceptional undernutrition on maternal metabolism, fetal growth and glucose-insulin axis function in ovine pregnancy. *J. Physiol.* 586(5): 1399-1411.
- **SAEVRE, C.; CATON, J.; LUTHER, J.; MEYER, A.; DHUYVETTER, D.; MUSSER, R.; KIRSCH, J.; KAPPAHN, M.; REDMER, D.; SCHAUER, C.** (2010). Effects of rumen-protected arginine supplementation on ewe serum amino acid concentration, circulating progesterone, and ovarian blood flow. *Proc. West. Sect. Am. Soc. Anim. Sci.* 61: 7-10.
- **SALES, F.; PACHECO, D.; BLAIR, H.; KENYON, P.; MCCOARD, S.** (2013). Muscle free amino acid profiles are related to differences in skeletal muscle growth between single and twin ovine fetuses near term. *SpringerPlus* 2(1): 483, 1-9.
- **SEFEROVIC, M.; ALI, R.; KAMEI, H.; LIU, S.; KHOSRAVI, J.; NAZARIAN, S.; HAN, V.; DUAN, C.; GUPTA, M.** (2008). Hypoxia and leucine deprivation induce human insulin-like growth factor binding protein-1 hyperphosphorylation and increase its biological activity. *Endocrinology* 150(1): 220-231.
- **SEMENZA, G.** (1999). Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual review of cell and developmental biology* 15(1): 551-578.
- **SHEHAB, M.; DAMERILL, I.; SHEN, T; ROSARIO, F.; NIJLAND, M.; NATHANIELSZ, P.; KAMAT, A.; JANSSON, T.; GUPTA, M.** (2014). Liver mTOR

controls IGF-I bioavailability by regulation of protein kinase CK2 and IGFBP-1 phosphorylation in fetal growth restriction. *Endocrinology* 155(4): 1327-1339.

- **SIBLEY, C.; TURNER, M.; CETIN, I.; AYUK, P.; BOYD, C.; D'SOUZA, S.; GLAZIER, J.; GREENWOOD, S.; JANSSON, T.; POWELL, T.** (2005). Placental phenotypes of intrauterine growth. *Pediatr. Res.* 58(5): 827–832.
- **SIBLEY, C.; GLAZIER, J.; D'SOUZA, S.** (1997). Transporter activity and expression in relation to fetal growth. *Exp. Physiol.* 82(2): 389-402.
- **SIBLEY, C.** (2009). Understanding placental nutrient transfer—Why bother? New biomarkers of fetal growth. *J. Physiol.* 587(14): 3431–3440.
- **SMITH, E.; FINN, S.; TEE, A.; BROWNE, G.; PROUD, C.** (2005). The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses. *J. Biol. Chem.* 280(19):18717–18727.
- **SORIA, R.; JULIAN, C.; VARGAS, E.; MOOE, L.; GIUSSANI, D.** (2013). Graduated effects of high-altitude hypoxia and highland ancestry on birth size. *Pediatr. Res.* 74(6): 633-638.
- **TAZUKE, S.; MAZURE, N.; SUGAWARA, J.; CARLAND, G.; FAESSEN, G.; SUEN, LI-FENG; IRWIN, J.; POWELL, D.; GIACCIA, A.; GIUDICE.** (1998). Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(17):10188–10193.
- **TSUKIHARA, T.; AOYAMA, H.; YAMASHITA, E.; TOMIZAKI, T.; YAMAGUCHI, H.; SHINZAWA-ITOH, K.; NAKASHIMA, R.; YAONO, R.; YOSHIKAW S.** (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272(5265): 1136-1144.
- **VATNICK, I., SCHOKNECHT, P., DARRIGRAND, R., BELL, A.** (1991). Growth and metabolism of the placenta after unilateral fetectomy in twin pregnant ewes. *J. Dev. Physiol.* 15(6): 351-356.
- **VIRRENGA, M.; BOROWICZ, P.; LUTHER, J.; PANT, D.; REDMER D.; GRAZUL-BILSKA, A.; REYNOLDS, L.** (2004). Vascular development of fetal placental cotyledons (COT) in singles, twin and triplet pregnancies in sheep. *J. Anim. Sci.* 82: 106-126.
- **VONNAHME, K.** (2012). Maternal nutrition and fetal programming. Department of Animal Sciences, North Dakota State University, Fargo. [En línea] <http://animal.ifas.ufl.edu/beef_extension/bcsc/2012/pdf/vonnahme.pdf>. [consulta: 3-5-2016].

- **VONNAHME, K.; HESS B.; NIJLAND, M.; NATHANIELSZ, P.; FORD, S.** (2006). Placentomal differentiation may compensate for maternal nutrient restriction in ewes adapted to harsh range conditions. *J. Anim. Sci.* 84(12): 3451-3459.
- **VON VERSEN-HOYNCK, F.; RAJAKUMAR, A.; PARROTT, M.; POWERS, R.** (2009). Leptin affects system A amino acid transport activity in the human placenta: Evidence for STAT3 dependent mechanisms. *Placenta* 30(4): 361–367.
- **WALLACE, J.; BOURKE, D.; AITKEN, R.** (1999). Nutritional and fetal growth: paradoxical effects in the overnourished adolescent sheep. *J. Reprod. Fert.* 54: 385-99.
- **WERNLI, C., DOBERT, H., SCHMITT, J., ALONSO, O., CERDA, D.** (1977). Estudios sobre el valor nutritivo de las praderas en Magallanes. *Boletín Técnico No 10. Estación Experimental Kampenaike-Estación Experimental La Platina* 54 p.
- **WILSON, S.; MCEWAN, J.; SHEARD, P.; HARRIS, A.** (1992). Early stages of myogenesis in a large mammal: formation of successive generations of myotubes in sheep tibialis cranialis muscle. *J. Muscl. Res. Cell. Motil.* 13(5): 534-550.
- **WOUTERS, B.; KORITZINSKY, M.** (2008). Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8(11): 851–864.
- **WU, G.; BAZER, F.; CUDD, T.; MEININGER, C.; SPENCER, T.** (2004). Maternal nutrition and fetal development. *J. Nutr.* 134(9): 2169-2172.
- **WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, MN.** (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124(3): 471–484.
- **YUNG, H.; CALABRESE, S.; HYNX, D.; HEMMINGS, B.; CETIN, I.; CHARNOCK-JONES, D.; BURTON, G.** (2008). Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction. *Am. J. Pathol.* 173(2): 451–462.
- **ZHANG, S.; REGNAULT, T.; BARKER, P.; BOTTING, K.; MCMILLEN, I.; MCMILLAN, C.; MORRISON, J.** (2015). Placental Adaptations in Growth Restriction. *Nutrients* 7(1): 360-389.
- **ZHU, M.; FORD, S.; MEANS, W.; HESS, B.; NATHANIELSZ, P.; DU, M.** (2006). Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *J. Physiol.* 575:(1), 241-50.
- **ZORZANO, A.** (2008). Utilización de glucosa durante la vida fetal y su relación nutricional. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Universidad de Barcelona.*

ANEXOS

Anexo N°1: Certificado de Bioética



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Comité de Bioética Animal

Santiago, 14 de junio de 2016

CERTIFICADO N° 11-2016

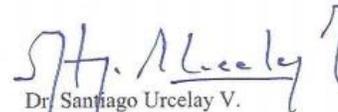
En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, y teniendo a la vista la metodología del Proyecto: **“Roles of hypoxia and oxidative stress on lamb fetal growth restriction by twin pregnancy and/or undernutrition: intervention with antioxidants”**. Este comité entiende que dicho proyecto corresponde al proyecto FONDECYT N°1160892, dirigido por el **Dr. Victor Hugo Parraguez** y financiado por el FONDECYT concurso Regular 2016.

De acuerdo a los detalles contenidos en el Formulario para obtención de certificado de Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, este Comité certifica que el Proyecto satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité, y se ajusta a la legislación chilena vigente sobre la materia, incluida la Norma NCh 324-2011.

A este respecto el Comité entiende que todos los ensayos se llevarán a cabo en ovinos hembra en la Región de Magallanes entre abril de 2016 y abril de 2019. Del total de animales 120 serán eutanasiados de acuerdo al protocolo adjunto y 180 continuarán en su sistema productivo de origen. Todos los ensayos serán supervisados y llevados a cabo por Médicos Veterinarios.


Dra. Tamara Tadich G.
Director
Comité de Bioética Animal




Dr. Santiago Urcelay V.
Presidente
Comité de Bioética Animal

Anexo N°2: Efectos de la gestación única y mellicera, y de dietas control (100% NRC) y restringida (70% NRC) a los 100 días de gestación. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p \leq 0,05$) entre las variables estudiadas.

Variables	Control único	Control mellizo	Restringido único	Restringido mellizo
Peso fetal	A	A	A	A
Longitud cabeza- cola	A	A	A	A
Largo de mano	A	A	A	A
Largo de pata	A	A	A	A
Perímetro torácico	A	A	A	A
PO2 vena umbilical	A	A	A	A
Saturación O2 vena umbilical	A	A	A	A
PCO2 vena umbilical	A	A	A	A
pH vena umbilical	A	A	A	A
Hematocrito vena umbilical	A	A	A	A
Peso oveja	A	A	A	A
Condición corporal oveja	A	A	A	A

Anexo N°3: Efectos de la gestación única y mellicera, y de las dietas control (100% NRC) y restringida (70% NRC) a los 140 días de gestación. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p \leq 0,05$) entre las variables estudiadas.

Variab les	Control único	Control mellizo	Restringido único	Restringido mellizo
Peso fetal	A	B	AB	C
Longitud cabeza- cola	A	A	A	B
Largo de mano	A	A	A	B
Largo de pata	A	B	A	B
Perímetro torácico	A	BC	AB	C
pO2 vena umbilical	A	B	B	B
Saturación O2 vena umbilical	A	B	B	B
pCO2 vena umbilical	A	A	A	A
pH vena umbilical	A	A	A	A
Hematocrito vena umbilical	A	A	A	A
Peso oveja	A	A	B	B
Condición corporal oveja	A	B	B	B
Peso placenta por oveja	B	A	B	A
Peso placenta por feto	A	AB	A	B
Número de placentomas por oveja	A	A	B	A
Número de placentomas por feto	A	C	B	C

Anexo N°4: Valores promedio de variables estudiadas a los 100 y 140 días de gestación.

Grupo	maternas		placentarias			
	Peso oveja Kg	CC oveja 1 a 5	peso placenta oveja g	peso placenta feto g	N° placentomas oveja	N° placentomas feto
CU	70,64	2,42	n/a	n/a	n/a	n/a
CM	66,74	1,94	n/a	n/a	n/a	n/a
RU	65,62	1,5	n/a	n/a	n/a	n/a
RM	58,91	2	n/a	n/a	n/a	n/a

Tabla N°3: Valores promedio por grupo de variables maternas y placentarias a los 100 días de gestación.

Grupo	gasométrico-sanguíneas					morfométricas				
	PO2 mmHg	SAT O2 %	PCO2 mmHg	pH	VGA %	Peso fetal Kg	Longitud cabeza-cola cm	Largo mano cm	Largo pata cm	Per torax cm
CU	20,34	26,88	51,71	7,37	40,7	1,111	28,27	17,38	20,54	21,88
CM	14,84	15,46	53,46	7,31	43	1,041	27,26	17,14	20,28	21,56
RU	17,45	22,2	59,35	7,32	40,42	1,082	27,5	16,7	20	21,95
RM	16,24	23,65	57,3	7,3	40,23	1,097	28,1	17,32	20,51	22,03

Tabla N°4: Valores promedio por grupo de variables gasométrico-sanguíneas y morfométricas fetales a los 100 días de gestación.

Grupo	maternas		placentarias			
	Peso oveja Kg	CC oveja 1 a 5	peso placenta oveja g	peso placenta feto g	N° placentomas oveja	N° placentomas feto
CU	77,14	2,78	404,34	404,34	84	84
CM	73,83	1,94	634,84	338,74	98	49
RU	64,81	1,37	405,48	405,48	69	69
RM	66,35	1,5	553,33	276,66	99	49

Tabla N°5: Valores promedio por grupo de variables maternas y placentarias a los 140 días de gestación.

Grupo	gasométrico-sanguíneas					morfométricas				
	PO2 mmHg	% SAT O2 %	PCO2 mmHg	pH	VGA %	Peso fetal Kg	Longitud cabeza-cola cm	Largo mano cm	Largo pata cm	Per torax cm
CU	34.1	60.95	39.44	7.44	46.78	4.5	45.78	31.94	37.27	36.05
CM	26.84	43.38	43.14	7.23	45.81	3.952	43.92	30.77	35.22	33.95
RU	27.05	43.92	43.2	7.46	41.5	4.282	44.83	31.45	37	34.53
RM	22.15	36.42	45.84	7.42	42.4	3.36	40.87	28.89	33.93	32.25
CM/RM	-17.5	-16.04	6.26	2.63	-7.44	-14.98	-6.94	-6.11	-3.66	-5.01

Tabla N°6: Valores promedio por grupo de variables gasométrico-sanguíneas y morfométricas fetales a los 140 días de gestación.

Anexo N°5: Diferencia porcentual de variables a los 140 días respecto de los 100 días.

Grupo	maternas		placentarias			
	Peso oveja	CC oveja	peso placenta oveja	peso placenta feto	N° placentomas oveja	N° placentomas feto
	%	%	%	%	%	%
CU	9,20	14,88	n/a	n/a	n/a	n/a
CM	10,62	0	n/a	n/a	n/a	n/a
RU	-1,23	-8,67	n/a	n/a	n/a	n/a
RM	12,63	-25	n/a	n/a	n/a	n/a

Tabla N°7: Diferencia % de valores promedio en variables maternas y placentarias a los 140 días respecto de los 100 días de gestación.

Grupo	gasométrico-sanguíneas					morfométricas				
	PO2	SAT O2	PCO2	pH	VGA	Peso fetal	Longitud cabeza-cola	Largo mano	Largo pata	Per torax
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
CU	67,6	126,7	-23,7	0,9	14,9	305	61,9	83,8	81,5	64,8
CM	80,9	180,6	-19,3	-1,1	6,5	279,6	61,1	79,5	73,7	57,5
RU	55	97,8	-27,2	1,9	2,7	295,7	63	88,3	85	57,3
RM	36,4	54	-20	1,6	5,4	206,3	45,4	66,8	65,4	46,4

Tabla N°8: Diferencia % de valores promedio en variables gasométrico-sanguíneas y morfométricas fetales a los 140 días respecto de los 100 días de gestación.

Anexo N°6: Diferencia porcentual de variables a los 140 días para los grupos CM, RU y RM respecto del grupo CU.

Grupo	maternas		placentarias			
	Peso oveja	CC oveja	peso placenta oveja	peso placenta feto	N° placentomas oveja	N° placentomas feto
	%	%	%	%	%	%
CM	-4,29	-30,22	57,0	-16,22	16,67	-41,67
RU	-15,98	-50,72	0,28	0,28	-17,86	-17,86
RM	-13,99	-46,04	36,85	-31,58	17,86	-41,67

Tabla N°9: Diferencia % de valores promedio en variables maternas y placentarias en los grupos CM, RU y RM respecto del grupo CU a los 140 días

Grupo	gasométrico-sanguíneas					morfométricas				
	PO2	% SAT O2	PCO2	pH	VGA	Peso fetal	Longitud cabeza-cola	Largo mano	Largo pata	Per torax
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
CM	-21,3	-28,8	9,4	-3	-2,1	-12,2	-4,1	-3,7	-5,5	-5,8
RU	-20,7	-27,9	9,5	0,3	-11,3	-4,8	-2,1	-1,5	-0,7	-4,2
RM	-35	-40,2	16,2	-0,3	-9,4	-25,3	-10,7	-9,5	-9	-10,5

Tabla N°10: Diferencia % de valores promedio en variables gasométrico-sanguíneas y morfométricas fetales en los grupos CM, RU y RM respecto del grupo CU a los 140 días.

