



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

**PARTICIPACIÓN DE LA NUTRICIÓN Y LA GESTACIÓN
MELLICERA EN LA RESTRICCIÓN DEL CRECIMIENTO
INTRAUTERINO DURANTE LOS PRIMEROS DOS TERCIOS DE LA
GESTACIÓN OVINA: INTERVENCIÓN CON ANTIOXIDANTES**

Gabriel Alfonso Peralta Chávez

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

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

PROYECTO FONDECYT 1160892

SANTIAGO, CHILE
2019



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

**PARTICIPACIÓN DE LA NUTRICIÓN Y LA GESTACIÓN
MELLICERA EN LA RESTRICCIÓN DEL CRECIMIENTO
INTRAUTERINO DURANTE LOS PRIMEROS DOS TERCIOS DE LA
GESTACIÓN OVINA: INTERVENCIÓN CON ANTIOXIDANTES**

Gabriel Alfonso Peralta Chávez

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

Nota Final

Prof. Guía: Dr. Víctor Hugo Parraguez Gamboa

Profesor Corrector: Dr. Luis Alberto Raggi Saini

Profesora Correctora: Dra. Carolina Paz Valenzuela Venegas

SANTIAGO, CHILE
2019

AGRADECIMIENTOS

Mediante estas líneas quisiera agradecer a todas y todos los que me apoyaron tanto en la realización de esta tesis como en mi formación de Médico Veterinario,

Al Dr. Víctor Hugo Parraguez, por su confianza, su dedicación, su paciencia y especialmente por permitirme trabajar con él en un proyecto tremendamente enriquecedor para mi formación.

A todas las personas del Laboratorio de Fisiología de FAVET, por su amabilidad, recibimiento grato y por compartir sus conocimientos y experiencias conmigo.

A los investigadores Francisco Sales y Raúl Lira, por permitirme aprender de unos excelentes profesionales y brindarme apoyo cada vez que se los solicité.

A todas las personas que forman parte de INIA Kampenaike, por regalarme una acogida excepcional, además de compartir compañía, risas y buenas intenciones.

A mis padres, por apoyarme incondicionalmente y de todas las maneras posibles durante mis años de estudio, sacrificándose ellos mismos para que pueda alcanzar mis metas.

A mis hermanas, por soportarme y no soportarme durante mis períodos de estrés agudo, por darme cariño, confianza y energías cada vez que lo necesitaba.

A mis mascotas Tara, Luna y Tortita, quienes me inspiraron a estudiar esta carrera y me enseñaron que los animales son seres nobles a los que siempre hay que tratar con respeto.

A todos mis profesores del Liceo de Aplicación, en especial a mis profesoras de Biología, quienes me mostraron las maravillas de esta ciencia.

A mis amigas y amigos, por darme su amistad, confianza y apoyo moral durante todos estos años.

A mi pareja, Paula Santibáñez, por permitirme conocerla y brindarme apoyo y contención emocional durante la culminación de este proceso.

A todas las personas que me han enseñado algo en la vida, comparta o no hoy en día con ustedes, ya que gracias a ustedes he aprendido a ser mejor persona.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
GESTACIÓN EN OVINOS	2
SUBNUTRICIÓN EN LA GESTACIÓN	3
GESTACIÓN MÚLTIPLE	4
HIPOXIA FETAL Y ESTRÉS OXIDATIVO	4
ANTIOXIDANTES.....	5
HIPÓTESIS	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
RESULTADOS	12
PESO Y CONDICIÓN CORPORAL DE LAS OVEJAS	12
EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE VITAMINAS C Y E SOBRE VARIABLES SANGUÍNEAS MATERNAS RELACIONADAS CON EL TRANSPORTE DE OXÍGENO	13
EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE VITAMINAS C Y E SOBRE VARIABLES SANGUÍNEAS UMBILICALES RELACIONADAS CON EL TRANSPORTE Y DISPONIBILIDAD DE OXÍGENO FETAL	15
EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE VITAMINAS C Y E SOBRE BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN SANGRE VENOSA UMBILICAL	17
EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE VITAMINAS C Y E SOBRE CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS FETALES.....	18
DISCUSIÓN	20
PESO Y CONDICIÓN CORPORAL MATERNA	20
VARIABLES MATERNAS RELACIONADAS CON EL TRANSPORTE DE OXÍGENO	21
VARIABLES FETALES RELACIONADAS CON EL TRANSPORTE DE OXÍGENO	22
CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS FETALES	25
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28
ANEXOS	35
CERTIFICADO BIOÉTFICA.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: VARIABLES DE PESO Y CONDICIÓN CORPORAL EN OVEJAS ÚNICAS Y MELLICERAS, CON O SIN SUPLEMENTO NUTRICIONAL, TRATADAS O NO CON VITAMINAS C Y E.....	13
FIGURA 2: VARIABLES SANGUÍNEAS MATERNAS RELACIONADAS CON EL TRANSPORTE DE O₂ EN OVEJAS ÚNICAS Y MELLICERAS, CON O SIN SUPLEMENTO NUTRICIONAL, TRATADAS O NO CON VITAMINAS C Y E.	14
FIGURA 3: VARIABLES SANGUÍNEAS UMBILICALES RELACIONADAS CON EL TRANSPORTE Y DISPONIBILIDAD DE O₂ FETAL EN OVEJAS ÚNICAS Y MELLICERAS, CON O SIN SUPLEMENTO NUTRICIONAL, TRATADAS O NO CON VITAMINAS C Y E.	16
FIGURA 4: CONCENTRACIÓN DE MDA Y CAT EN SANGRE VENOSA UMBILICAL DE OVEJAS ÚNICAS Y MELLICERAS, CON O SIN SUPLEMENTO NUTRICIONAL, TRATADAS O NO CON VITAMINAS C Y E.	17
FIGURA 5: MEDIDAS BIOMÉTRICAS FETALES DE OVEJAS ÚNICAS Y MELLICERAS, CON O SIN SUPLEMENTO NUTRICIONAL, TRATADAS O NO CON VITAMINAS C Y E.	19

RESUMEN

El presente estudio evaluó la hipótesis de que la gestación mellicera y la subnutrición materna en la preñez ovina generan hipoxia fetal y estrés oxidativo, afectando el normal crecimiento fetal, lo cual podría ser prevenido mediante la administración diaria de vitaminas antioxidantes, C y E. Se ocuparon ovejas de preñez única y doble, a la mitad de cada tipo de gestación se les manejó únicamente bajo pastoreo, supliendo aproximadamente un 70% de sus requerimientos nutricionales, mientras que a la otra mitad se les suplementó con un concentrado comercial para alcanzar el total de sus requerimientos nutricionales. A su vez, dentro de cada nivel nutricional, a la mitad de los animales se les administró diariamente una dosis oral de vitaminas C y E, iniciándose todos los manejos desde el día 30 de gestación. Al día 100 de gestación se midieron características de oxigenación en la sangre arterial materna y venosa umbilical, además de biomarcadores de estrés oxidativo en sangre fetal y características biométricas fetales. La gestación mellicera y la subnutrición materna afectó negativamente la oxigenación fetal y su combinación genera condiciones francamente hipóxicas a nivel fetal. Por su parte, la administración diaria de vitaminas antioxidantes mejoró el aporte de O₂ a los fetos. No se evidenció modificación en los biomarcadores de estrés oxidativo (MDA y CAT fetal), por lo cual probablemente el grado de hipoxia fetal fue leve a esta edad gestacional, o bien el estatus antioxidante endógeno fue suficiente para contrarrestar los efectos de la hipoxia como inductor de estrés oxidativo. La subnutrición y la gestación mellicera disminuyeron el tamaño y el peso fetal, con máximo efecto en gestaciones melliceras bajo subnutrición. En conclusión, a los 100 días de preñez la gestación mellicera, la subnutrición y su combinación conducen a una restricción del crecimiento intrauterino, la cual se podría deber a la disminución del traspaso de otros nutrientes por sobre el efecto de la hipoxia y estrés oxidativo, razón por la cual no existiría un claro efecto benéfico de la administración de vitaminas C y E.

Palabras Clave: gestación mellicera, subnutrición, ovinos, hipoxia, vitaminas antioxidantes.

ABSTRACT

The present study evaluated the hypothesis that twin pregnancies and undernutrition in the sheep pregnancy generates fetal hypoxia and oxidative stress, affecting the normal fetal growth, which can be prevented by the daily administration of antioxidant vitamins, C and E. Single and twin sheep pregnancies were used, half of each type of gestation were handled only under grazing, supplying about 70% of their nutritional requirements, while the other half were supplemented with a commercial concentrate to reach the total of their nutritional requirements. Additionally, within each nutritional level, half of the animals were given a daily oral dose of vitamins C and E, starting from day 30 of gestation. At day 100 of gestation, oxygenation characteristics in maternal arterial and venous umbilical blood were measured, as well as biomarkers of oxidative stress in the fetal blood and fetal biometric characteristics. Twin pregnancy and undernutrition negatively affects the conditions of fetal oxygenation, and their combination actually generates fetal hypoxia. On the other hand, the daily administration of antioxidant vitamins improve the O₂ supply to the fetuses. There was no increase of oxidative stress biomarkers (MDA and fetal TAC), thus the degree of fetal hypoxia is probably slight at this gestational age, or the endogenous antioxidant status is enough to counteract the effects of hypoxia as inducer of oxidative stress. Undernutrition and twin pregnancy decreased fetal size and weight, with the maximum effect in twin pregnancies with undernutrition. In conclusion, at 100 days of gestation twin pregnancies, undernutrition and their combination lead to intrauterine growth restriction, which would be explained due to the decrease in the transfer of other nutrients over the effect of hypoxia and oxidative stress, therefore a clear beneficial effect of the vitamins C and E administration was not detected at this gestational period.

Keywords: twin pregnancy, undernutrition, sheep, hypoxia, antioxidant vitamins.

INTRODUCCIÓN

Según el censo agropecuario del año 2007, en Chile existen aproximadamente cuatro millones de ovinos, siendo la región de Magallanes y la Antártica Chilena la que registra el mayor número de cabezas, con un 56% del total. En esta región la ganadería ovina empezó a desarrollarse desde la segunda mitad del siglo XIX, siendo hoy en día el segundo rubro en importancia económica y parte relevante de la cultura de la región.

Desde el inicio de la historia ganadera ovina en Magallanes, el sistema de producción ha sido de tipo “doble propósito”: carne y lana. La raza más utilizada por los productores es la Corriedale, quienes por tradición han tenido a la lana como principal producto. Sin embargo, la dinámica del mercado ha llevado a la carne a tener mayor relevancia en la rentabilidad del sistema.

Estrategias para aumentar la producción de carne que resulten beneficiosas y aplicables para el contexto de Magallanes pueden ser atractivas para los productores. Tomando en cuenta que la gestación de las ovejas se desarrolla en el momento en que hay menor disponibilidad de alimento en la pradera (subnutrición materna) y que además se evidencia la obtención de dos crías por oveja al parto (oveja mellicera) como un manejo rentable para el sistema, se estudió el efecto de suplementación con vitaminas antioxidantes durante la gestación en ovejas mantenidas bajo condiciones de manejo estándar para la región. Esto debido a que se relaciona la sinergia de ambas condiciones, subnutrición y preñez múltiple, con una hipoxia fetal que generaría estrés oxidativo, que puede afectar el desarrollo y crecimiento de los individuos en la gestación.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Gestación en ovinos

El promedio de duración de la gestación en ovinos es de 147 días. En este proceso, los patrones de crecimiento para la placenta y el feto difieren. Por un lado, el crecimiento fetal se caracteriza por ser lento durante la primera mitad de la gestación, alcanzando al final de este período solo un 10% del peso total al nacer. En la segunda mitad, en cambio, ocurre un crecimiento fetal exponencial, donde se pueden obtener ganancias de peso corporal entre 70 a 150 gr/día durante los días cercanos al parto. Por otro lado, el crecimiento mayoritario de la placenta ocurre principalmente en la primera mitad de la gestación, aumentando progresivamente desde el período peri-implantacional (16 a 30 días de la gestación) hasta el día 75-80 de la preñez, en donde alcanza su máximo desarrollo, medido en términos de peso, tamaño y superficie (Gootwine *et al.*, 2007).

Inicialmente los ovinos tienen una placenta epiteliocorial no invasiva. Tras la implantación, la membrana corioalantoídea del concepto se alarga y, a través de un mecanismo desconocido, forma cotiledones que se interdigitan con las carúnculas del endometrio para formar placentomas. Desde entonces la placenta comienza a clasificarse como sindesmocorial. Los placentomas corresponden a las unidades funcionales que en su conjunto forman la placenta, siendo responsables del intercambio de O₂, nutrientes, iones y micronutrientes claves de la madre al feto, así como desechos, como el dióxido de carbono (CO₂) y la urea, en dirección opuesta (Gootwine *et al.*, 2007; Vaughan y Fowden, 2016). Una oveja con gestación única posee en promedio unos 70 placentomas, estos aumentan su vascularización a medida que se desarrolla la gestación, lo que es acompañado por un aumento del flujo sanguíneo uterino para satisfacer adecuadamente los crecientes requerimientos de nutrientes y de gases del feto y la placenta. Así, mientras que la tasa de flujo sanguíneo uterino total es de aproximadamente 0,4 L/min a los 71 días de gestación, al día 130 este aumenta a unos 1,21 L/min (Gootwine *et al.*, 2007). Por otro lado, la placenta produce hormonas y factores de crecimiento que se liberan en las circulaciones materna y fetal, los cuales tienen un papel clave en el mantenimiento y las adaptaciones fisiológicas maternas durante la gestación, que son esenciales para satisfacer las demandas crecientes de nutrientes del feto en desarrollo. Finalmente, la placenta actúa como una

barrera que restringe el acceso de las hormonas maternas y xenobióticos al feto, por inactivación enzimática o transportándolas de vuelta a la circulación materna (Vaughan y Fowden, 2016).

Es importante destacar que la insuficiencia placentaria es una de las causas más comunes de restricción del crecimiento intrauterino (IUGR, por sus siglas en inglés). Esto causado por una disminución del tamaño placentario o una disminución de la capacidad de transporte que altera finalmente la transferencia de nutrientes, O₂ y agua al feto desde el compartimento materno a través del complejo útero-placentario, afectando el crecimiento fetal (Gootwine *et al.*, 2007; Morrison, 2008). Tomando en cuenta que se ve afectado el peso al nacimiento debido a la IUGR, cabe mencionar que se ha demostrado que el bajo peso al nacimiento tiene una directa relación con un aumento de la mortalidad neonatal, alteraciones del crecimiento posnatal e incremento de la probabilidad de padecer enfermedades metabólicas (Sharma *et al.*, 2012).

Lo anterior se asocia con un fenómeno denominado programación fetal. Este puede ser definido como una respuesta del organismo frente a un desafío específico durante un periodo crítico del desarrollo intrauterino, cuando las divisiones celulares ocurren de manera rápida en varios tejidos, pudiendo alterar la expresión del genoma fetal, modificando la trayectoria del desarrollo intrauterino y trayendo consigo posibles efectos durante toda la vida (Igwebuike, 2010; Rabadán-Diehl y Nathanielsz, 2013). Muchas de estas alteraciones son producidas durante las primeras etapas del crecimiento intrauterino, atribuyéndose a la nutrición uno de los roles más importantes en la modificación permanente de los patrones de expresión génica durante la gestación tardía y la vida posnatal (Beltrán y Alomar, 2011).

Subnutrición en la gestación

Estudios evidencian que, a través de la disminución de la nutrición materna, se puede generar IUGR, asociada con una reducción del tamaño de la placenta y potencialmente en su funcionalidad (Gootwine *et al.*, 2007; Igwebuike, 2010). El efecto dependerá de la gravedad y el momento de la gestación en que se presente la subnutrición (Gootwine *et al.*, 2007). Se evidenció que el ayuno completo en ovejas que gestan una cría se produce una marcada reducción del flujo sanguíneo uterino, además de concentraciones más bajas de

glucosa y aminoácidos en la sangre materna. Asimismo, la restricción del 50% de los requerimientos de nutrientes para ovejas de similares características entre los días 28 y 78 de gestación, redujo significativamente los pesos fetales y placentarios. Es decir, existe una IUGR debido a una reducción en el flujo sanguíneo uterino y concentraciones más bajas de los metabolitos circundantes entre la madre y el feto (Gootwine *et al.*, 2007).

Gestación múltiple

La preñez múltiple es un factor dentro de las condicionantes del medio ambiente uterino que también puede causar IUGR, cuya magnitud dependerá del tamaño de la camada. Se estima que la ganancia de peso fetal durante la última parte de la gestación es de aproximadamente 100 gr/día en los mellizos y de 200 gr/día para crías únicas (Gootwine, 2005). Al entender que una disminución en el crecimiento fetal es el reflejo de un menor traspaso de nutrientes y O₂ a través de la placenta, es evidente concluir que este decaimiento es reflejo de una insuficiencia del complejo útero-placentario para apoyar adecuadamente la gestación múltiple. Lo anterior se asocia a la disminución del número de placentomas disponibles por fetos en gestaciones melliceras, al ser comparadas las gestaciones únicas, donde se pueden encontrar 40 versus 70 placentomas disponibles por concepto, respectivamente (Gootwine *et al.*, 2007). Además, si bien existe un aumento en el tamaño promedio de estas estructuras y un incremento en la vascularización de los cotiledones, la placenta de mellizos no alcanza la masa total por feto que presenta una placenta de gestaciones únicas (Virrenga *et al.*, 2004).

Hipoxia fetal y estrés oxidativo

La hipoxia es definida como el suministro defectuoso de O₂ para las demandas fisiológicas de un tejido. Como se ha visto, tanto la subnutrición materna como la gestación múltiple, pueden traer consigo una insuficiencia placentaria. Esta insuficiencia conduce a una IUGR debido a una inadecuada tasa de intercambio y a una disminución de la perfusión placentofetal, con un aporte restringido de nutrientes y O₂ (Herrera *et al.*, 2014). Uno de los mecanismos por los cual la hipoxia induce a daño tisular es a través de un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), por disminución del aceptor final en la cadena respiratoria. Concentraciones relativamente bajas de ROS son necesarias para operar como señalizadores moleculares en la diferenciación y normal funcionamiento

celular. Sin embargo, un aumento en la generación de ROS puede superar la capacidad antioxidante endógena y conducir a un estado de estrés oxidativo (Herrera *et al.*, 2014).

El estrés oxidativo puede modificar de manera irreversible componentes celulares, como proteínas, lípidos y ADN, ya que estas ROS interactúan con las moléculas adquiriendo un electrón desde ellas, volviéndolas inestables y reproduciendo el mismo proceso en las moléculas vecinas, pudiendo llevar consigo daño y disfunción celular (Agarwal *et al.*, 2005; Garrel *et al.*, 2010). Además, el estrés oxidativo conduce a la inducción (activación) de la transcripción de factores hipoxia inducibles (HIF) y factor kappa nuclear (*dNFk*), capaces de inducir vasoconstricción y remodelación vascular, afectando la capacidad de vasodilatación en la vasculatura placentaria, lo que se asocia con un aumento el riesgo de IURG (Herrera *et al.*, 2014).

Antioxidantes

Los antioxidantes actúan en el organismo como dadores de electrones, evitando la cadena de óxido-reducción, sacrificando su propia entidad y encontrándose integrados armónicamente a nivel intra y extracelular para lograr el máximo nivel de protección (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2009). Tres son los mecanismos mediante los que pueden actuar. En primer lugar, están los enzimáticos, que metabolizan los radicales libres generados durante los procesos metabólicos. En segundo lugar, están los no enzimáticos, que destruyen directamente los radicales libres que se generan. Finalmente, están los terciarios que reparan biomoléculas que se dañan por la acción de los radicales libres (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2009).

Las vitaminas C y E actúan como antioxidantes no enzimáticos, previniendo la acumulación de ROS atrapándolas y reduciéndolas a productos finales estables, evitando el daño oxidativo (Saraswat *et al.*, 2014). En estudios realizados en ovejas bajo condiciones de hipoxia hiopobárica, en donde las gestaciones cursan con hipoxemia materna y fetal, se ha encontrado que el efecto del estrés oxidativo puede prevenirse mediante la administración diaria de las vitaminas antioxidantes C y E. Además, el tratamiento trajo consigo mejores resultados en la preñez, tales como un mayor peso al nacimiento de los corderos y una disminución significativa de la brecha existente entre los pesos de los

corderos nacidos de madres en condiciones de hipoxia, comparado con aquellos nacidos en ovejas criadas en normoxia (Parraguez *et al.*, 2011).

En base a lo descrito, se propone que la administración de vitaminas antioxidantes genera un efecto positivo en el crecimiento intrauterino durante los dos primeros tercios de la gestación, contrarrestando las consecuencias provocadas por la sinergia de la subnutrición materna y la gestación mellicera.

HIPÓTESIS

La subnutrición materna y la gestación mellífera genera hipoxia fetal y estrés oxidativo, impactando negativamente el crecimiento intrauterino durante los dos primeros tercios de la gestación. Esto puede ser prevenido mediante la administración oral de vitaminas antioxidantes, C y E.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos de la administración de vitaminas C y E sobre el crecimiento fetal de mellizos en madres bajo subnutrición, durante los primeros dos tercios de la gestación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer a los 100 días de gestación, los efectos de la administración de vitaminas C y E sobre variables sanguíneas involucradas con el transporte y la disponibilidad de oxígeno fetal.
2. Establecer a los 100 días de gestación, los efectos de la administración de vitaminas C y E sobre biomarcadores de estrés oxidativo en el feto.
3. Establecer a los 100 días de gestación, los efectos de la administración de vitaminas C y E sobre características biométricas fetales.

MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo experimental utilizado en la presente memoria fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Certificado 11-2016).

Este estudio se llevó a cabo en las dependencias del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), específicamente en el Centro Regional de Investigación (CRI) Kampenaike, el cual se encuentra a 65 Km al noreste de la ciudad de Punta Arenas, en la XII Región de Magallanes, Chile (Lat 52° 36'; Lon 70° 56') y en el Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Se seleccionaron alrededor de 120 ovejas de raza Corriedale, que se encontraran entre la tercera y quinta preñez, con pesos y condiciones corporales similares (2,5-3 en la escala de 1 a 5). A mediados de la estación reproductiva se implementó un protocolo de sincronización de celo y superovulación, el cual se inició con la inyección intramuscular de un análogo a la prostaglandina F2 α (125 μ g cloprostenol, Estrumate®: ICI, Macclesfield, U.K.). Once días después se siguió con la colocación de un dispositivo intravaginal de 0,3 gr de progesterona (Eazi-breed™ CIDR® G, Pfizer Animal Health; Nueva Zelanda) durante 11 días. Luego, simultáneo al retiro del dispositivo, se inyectó vía intramuscular una dosis de 400 UI de gonadotrofina coriónica equina (Novormon 5000®, Syntex, Argentina) (Saevre *et al.*, 2010). El encaste se realizó mediante monta natural durante 4 días, ocupando 8 carneros de fertilidad probada. A estos machos se les pintó el pecho con una mezcla de aceite de comer y tierra de color, modificando diariamente el color, de modo de poder visualizar las ovejas que fueron montadas en cada día y definir con precisión el inicio de la gestación.

Transcurridos 28 días desde el inicio del encaste, se realizó una ecografía a las ovejas marcadas, con el fin de diagnosticar la gestación y diferenciar gestaciones únicas de las melliceras.

Se formaron grupos en base a tres criterios: tipo de gestación (única= U, o mellicera= M); alimentación de las ovejas (solo consumo de pradera natural= P, o consumo de pradera

natural más suplementación con concentrado=P+S) y la administración o no de vitaminas C y E (V= suplementación con vitaminas).

Tanto para los animales con gestación única como mellicera, se seleccionaron treinta y dos animales por tipo de gestación, los cuales se dividieron en dos para la implementación de los distintos planos nutricionales. A su vez, dentro de cada plano nutricional se seleccionó la mitad para la administración de vitaminas C y E. De acuerdo a ello, se cuenta con los siguientes grupos experimentales: ovejas con feto único alimentadas solo con pradera natural (grupo UP, n=8); ovejas con mellizos alimentadas solo con pradera natural (grupo MP, n=8); ovejas con feto único alimentadas con pradera natural más suplemento concentrado (grupo UPS, n=8); ovejas con mellizos alimentadas con pradera natural más suplemento concentrado (grupo MPS, n=8); ovejas con feto único alimentadas solo con pradera natural, tratadas con vitaminas C y E (grupo UP+V, n=8); ovejas con mellizos alimentadas solo con pradera natural, tratadas con vitaminas C y E (grupo MP+V, n=8); ovejas con feto único alimentadas con pradera natural más suplemento concentrado, tratadas con vitaminas C y E (grupo UPS+V, n=8); ovejas con mellizos alimentadas con pradera natural más suplemento concentrado, tratadas con vitaminas C y E (grupo MPS+V, n=8).

Todos los animales fueron manejados en el mismo potrero, alimentándose en base a pradera natural (mata verde-coirón), caracterizados por bajo aporte de proteínas y energía (promedios de 4-6% PC y 2,1 Mcal/kg), especialmente durante el invierno, época durante la que transcurre el período gestacional en los ovinos (Lira, 2012). Se calcula que, por lo tanto, la gestación en los ovinos de esta región se lleva a cabo con una restricción de un 30% de los requerimientos nutricionales (Lira, 2012). Para alcanzar una nutrición de un 100% de los requerimientos, se suplementó diariamente con un concentrado comercial (Cosetan; 17% PC y 3,2 Mcal/kg, Iansa), calculado según el peso de los animales y la etapa de la gestación (NRC, 2007). Para el caso de las vitaminas antioxidantes, se administró diariamente una dosis oral de 10 mg/kg de vitamina C y 7 UI/kg de vitamina E, siendo prudente destacar que los requerimientos diarios de vitamina E corresponde a 5,3 UI/kg (NRC, 2007). Estas dosificaciones han demostrado aumentar la concentración de vitaminas en la sangre de los animales, previniendo el estrés oxidativo en ovejas mantenidas bajo

hipoxia crónica (Parraguez *et al*, 2011). Tanto la dosificación de las vitaminas como la suplementación se realizó en la manga y corrales del CRI durante horas de la tarde, a partir del día siguiente del examen ecográfico. Además, los animales fueron pesados y evaluados para condición corporal por una persona cada 15 días.

Al día 100 de gestación se realizó una cesárea para extraer el o los fetos de cada hembra preñada. Las ovejas se anestesiaron mediante una inyección de un bolo intravenoso de ketamina (20 mg/kg de peso corporal). Una vez anestesiada la oveja se extrajo con jeringas heparinizadas una muestra de sangre arterial (carótida) con el propósito de evaluar la presión parcial de O₂ y de CO₂, la saturación de hemoglobina por O₂, el pH y el hematocrito, a través de un analizador de gases IL Synthesis 25 (Laboratorio de Instrumentación, Lexington, Massachusetts, EE.UU.), ajustado a la temperatura corporal de los ovinos. La cirugía consistió en una laparotomía ventromedial y una subsiguiente histerotomía. Tras esto último, se ubicó el cordón umbilical para extraer dos muestras de sangre venosa con jeringas heparinizadas. La primera se utilizó para la medición de las mismas variables de sangre arterial materna. La muestra restante fue centrifugada y el plasma obtenido fue almacenado en nitrógeno líquido hasta la medición de los biomarcadores de estrés oxidativo malondialdehído (MDA) y capacidad antioxidante total (CAT).

Tras la obtención de muestras se extrajo el feto, el cual fue eutanasiado mediante una inyección intracardíaca de tiopental en sobredosis. Luego, se procedió al secado, sexaje, pesaje y medición de las características biométricas de los fetos, las cuales incluyeron la longitud céfalo-caudal, perímetro torácico, largo de pata y largo de mano. Finalmente, se procedió a la síntesis de los tejidos maternos y administración de antibióticos y analgésicos/antiinflamatorios. Los animales estuvieron bajo vigilancia por un día antes de ser devueltos al rebaño general.

Se usaron 100 µL de plasma sanguíneo para determinar MDA mediante el Kit de ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés) (Caimán Chemical Company, Ann Arbor, EE.UU.). En este caso, la absorbancia se midió usando un lector de microplacas de 540 nm. Por su parte, CAT se midió en 10 µL de plasma fetal utilizando el Kit de ensayo antioxidante ® (kit comercial de ELISA, Caimán Chemical

Company, Ann Arbor, EE.UU.). Aquí, se utilizó un lector de microplacas de 405 nm para su medición. Todos los ensayos se realizaron según las instrucciones del proveedor y han sido previamente probados en plasma sanguíneo ovino (Parraguez et al., 2011).

Los datos obtenidos para las variables estudiadas fueron analizados para verificar si se ajustaban a una distribución normal, mediante la prueba de Shapiro Wilk. Posteriormente se realizó comparaciones mediante pruebas paramétricas, a través del software estadístico SPSS-15. Las comparaciones incluyeron tres factores cruzados: el tipo de gestación según el número de fetos (individual y mellizos), el nivel nutricional (solo pradera o pradera más suplemento) y suplementación de las vitaminas antioxidantes (con o sin vitaminas). Cuando un factor resultó ser significativo se realizó la prueba de Duncan para evidenciar diferencias entre grupos. Se consideró una probabilidad de $P \leq 0,05$ para que fuera estadísticamente significativo. Los resultados fueron expresados como medias \pm error estándar de la media.

RESULTADOS

Peso y condición corporal de las ovejas

En la figura 1 se muestran las variables de peso y condición corporal de las ovejas durante los primeros 100 días de gestación. En el caso del peso (Fig. 1A), éste fue en disminución para todos los grupos hasta aproximadamente el día 45 de gestación, a partir de aquí se aprecia un leve aumento de peso en animales suplementados, a diferencia de las ovejas alimentadas a pradera que mantuvieron o bajaron de peso en las siguientes evaluaciones. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos hasta el día 80 de preñez, siendo el factor alimentación significativo ($P < 0,001$), reflejándose en un peso mayor en aquellos animales que fueron suplementados ($60,82 \pm 0,64$ kg vs $53,42 \pm 0,79$ kg, respectivamente). Sumado a esto, cada grupo suplementado resultó tener diferencias significativas con su control sin suplemento ($P \leq 0,05$). Similarmente, la alimentación también tuvo efecto significativo ($P < 0,001$) en el pesaje de las madres en el día 100 de gestación, siendo las madres que recibieron suplementación nutricional las más pesadas ($63,77 \pm 0,68$ kg vs $53,05 \pm 0,79$ kg, respectivamente).

Para el caso de la condición corporal (Fig. 1B), la nutrición resultó ser un factor significativo ($P < 0,001$) al día 100 de gestación, teniendo mejor condición aquellos animales que recibieron suplemento ($2,6 \pm 0,11$ vs $1,4 \pm 0,07$, respectivamente). Consistente con lo anterior, todos los grupos que recibieron concentrado muestran diferencias significativas con su par restringido nutricionalmente ($P \leq 0,005$).

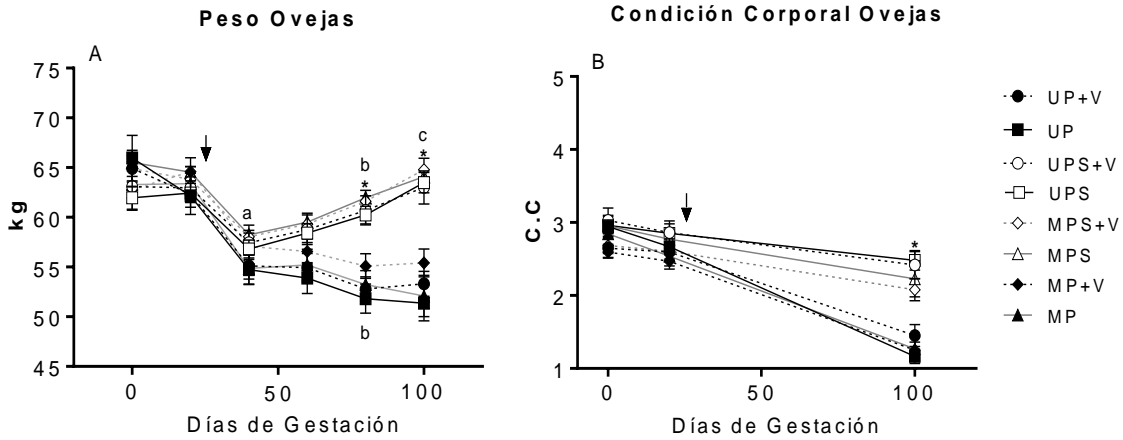


Figura 1: Peso y condición corporal durante los 100 primeros días de gestación, en ovejas únicas y melliceras, con o sin suplemento nutricional, tratadas o no con vitaminas C y E. La flecha indica el inicio de la suplementación nutricional y administración de las vitaminas antioxidantes. Asteriscos (*) indican diferencias significativas entre grupos suplementados vs no suplementados en el mismo período ($P \leq 0,05$). La letra “a” indica diferencias significativas dentro de los grupos en relación con el pesaje anterior. La letra “b” indica diferencias significativas dentro de los grupos en relación con el tercer pesaje. La letra “c” indica diferencias significativas dentro de los grupos en relación con el pesaje anterior.

Efectos de la administración de vitaminas C y E sobre variables sanguíneas maternas relacionadas con el transporte de oxígeno

En la figura 2 se presentan las variables sanguíneas maternas involucradas en el transporte de O_2 . No se observaron diferencias significativas entre los grupos al comparar los promedios de la presión parcial de O_2 (Fig. 2A), la presión parcial de CO_2 (Fig. 2B), el pH (Fig. 2C) y la saturación de hemoglobina por O_2 (Fig. 2D) en sangre arterial materna. Consistente con lo anterior, ninguno de los factores en estudio (número de fetos; nivel nutricional; administración de vitaminas) mostraron efecto significativo sobre estas variables. En el caso del hematocrito (Fig. 2E), sin embargo, el factor nutrición resultó ser significativo, hallándose un promedio mayor en madres que recibieron suplemento ($32,19 \pm 0,64\%$ vs $29,48 \pm 0,72\%$, respectivamente; $P = 0,015$), con diferencias significativas entre

los grupos, siendo el grupo MPS+V el que presentó el mayor valor promedio y el grupo UP+V el que registró el más bajo ($P \leq 0,05$).

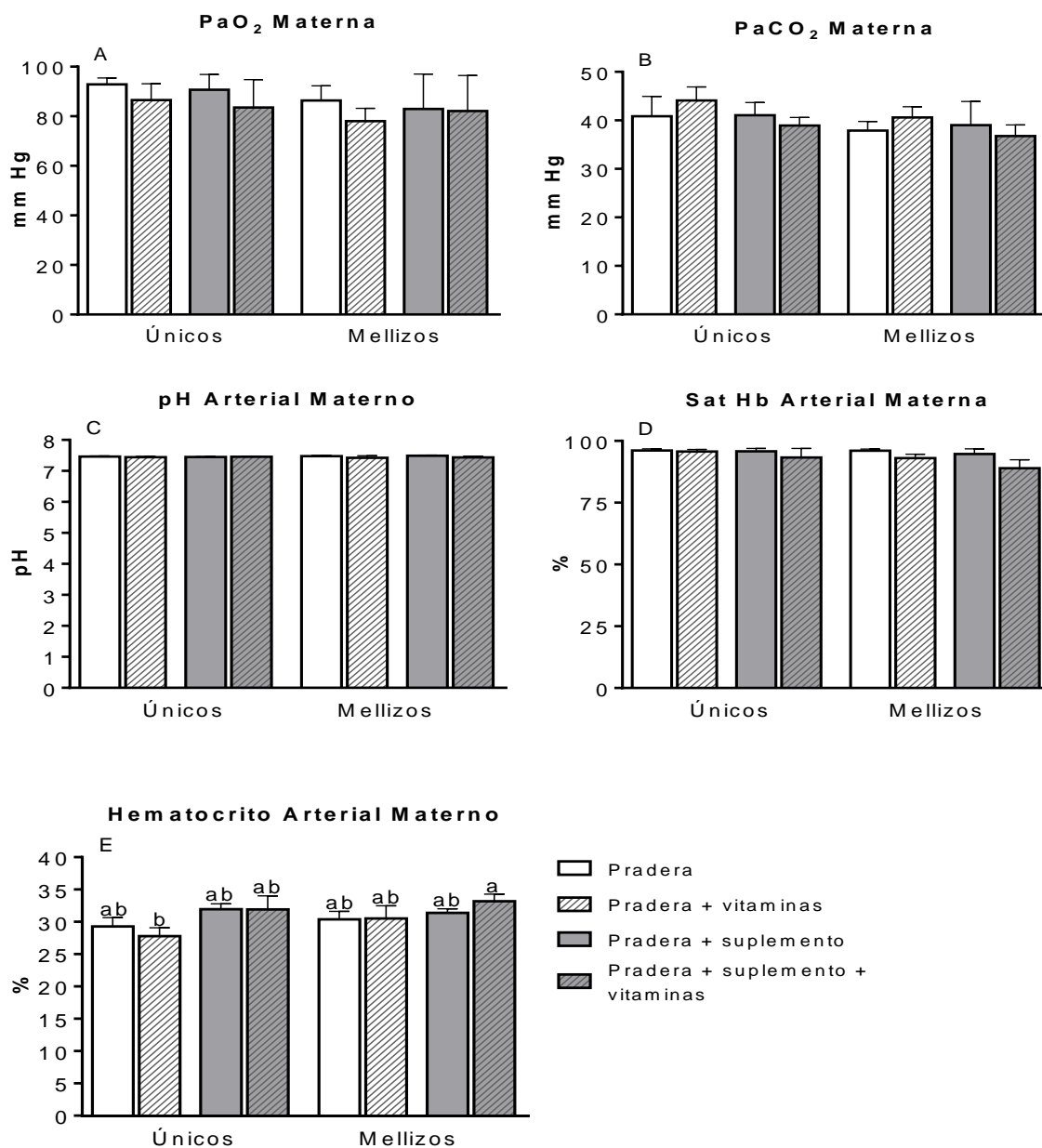


Figura 2: Variables sanguíneas maternas relacionadas con el transporte de O₂ en ovejas con preñez de 100 días, únicas y melliceras, con o sin suplemento nutricional, tratadas o no con vitaminas C y E. Letras distintas en las barras indican diferencias significativas, con $P \leq 0,05$.

Efectos de la administración de vitaminas C y E sobre variables sanguíneas umbilicales relacionadas con el transporte y disponibilidad de oxígeno fetal

El tamaño de camada y el tratamiento con vitaminas mostraron ser factores estadísticamente significativos en la presión parcial de O₂ en la sangre venosa umbilical (P = 0,001 y 0,044, respectivamente). Ovejas con gestación única muestran una mayor presión parcial de O₂ en la sangre de vena umbilical, en comparación con las melliceras (25,32 ± 1,12 mm Hg vs 20,62 ± 0,87 mm Hg, respectivamente). Por otro lado, aquellas suplementadas con antioxidantes presentan una PO₂ mayor en relación con aquellas que no la recibieron (23,73 ± 1,05 mm Hg vs 20,88 ± 0,97 mm Hg, respectivamente). Como se observa en la Figura 3A, el grupo UPS+V resultó ser el grupo con el promedio más alto, mientras que el grupo MP presentó el más bajo (P ≤ 0,05). Pese a que grupos que recibieron suplemento con concentrado o tratamiento con vitaminas muestren mayores valores al ser comparados con sus respectivos controles, estas no resultaron en diferencias significativas.

Para el caso de la presión parcial de CO₂ en sangre venosa umbilical, la alimentación resultó ser un factor significativo (P < 0,001). En este caso, ovejas adecuadamente nutridas muestran menores concentraciones sanguíneas de CO₂ (49,44 ± 1,17 mm Hg vs 56,21 ± 0,98 mm Hg, respectivamente). A la comparación entre grupos, como se puede ver en la Figura 3B, las mayores diferencias se encontraron entre los grupos MP, que presentó la mayor PCO₂ y los grupos MPS y MPS+V, que mostraron los menores valores (P ≤ 0,05).

Los tres factores (alimentación, número de fetos y suplementación vitamínica) mostraron ser significativos para la variable saturación de hemoglobina por O₂. Ovejas melliceras tuvieron una menor saturación de O₂ comparadas con las de feto único (26,44 ± 1,92% vs 36,82 ± 2,24%, respectivamente; P = 0,002). Por su parte, las madres que recibieron suplemento nutricional presentaron valores más altos en relación con las que únicamente se alimentaron en base a pradera natural (33,1 ± 2,29% vs 27,09 ± 2,07%, respectivamente; P = 0,05). De igual manera, la administración de vitaminas C y E aumentó el promedio de esta variable al compararse con aquellos animales sin este tratamiento (33 ± 2,2 % vs 26,6 ± 2,11%, respectivamente; P = 0,04). Como se observa en la Figura 3D, el mayor valor lo presentó el grupo UPS+V, mientras que el menor el grupo MP (P ≤ 0,05). Por otro lado, no

se encontraron diferencias significativas para las variables de pH (Fig. 3C) y hematocrito (Fig. 3E) venoso umbilical.

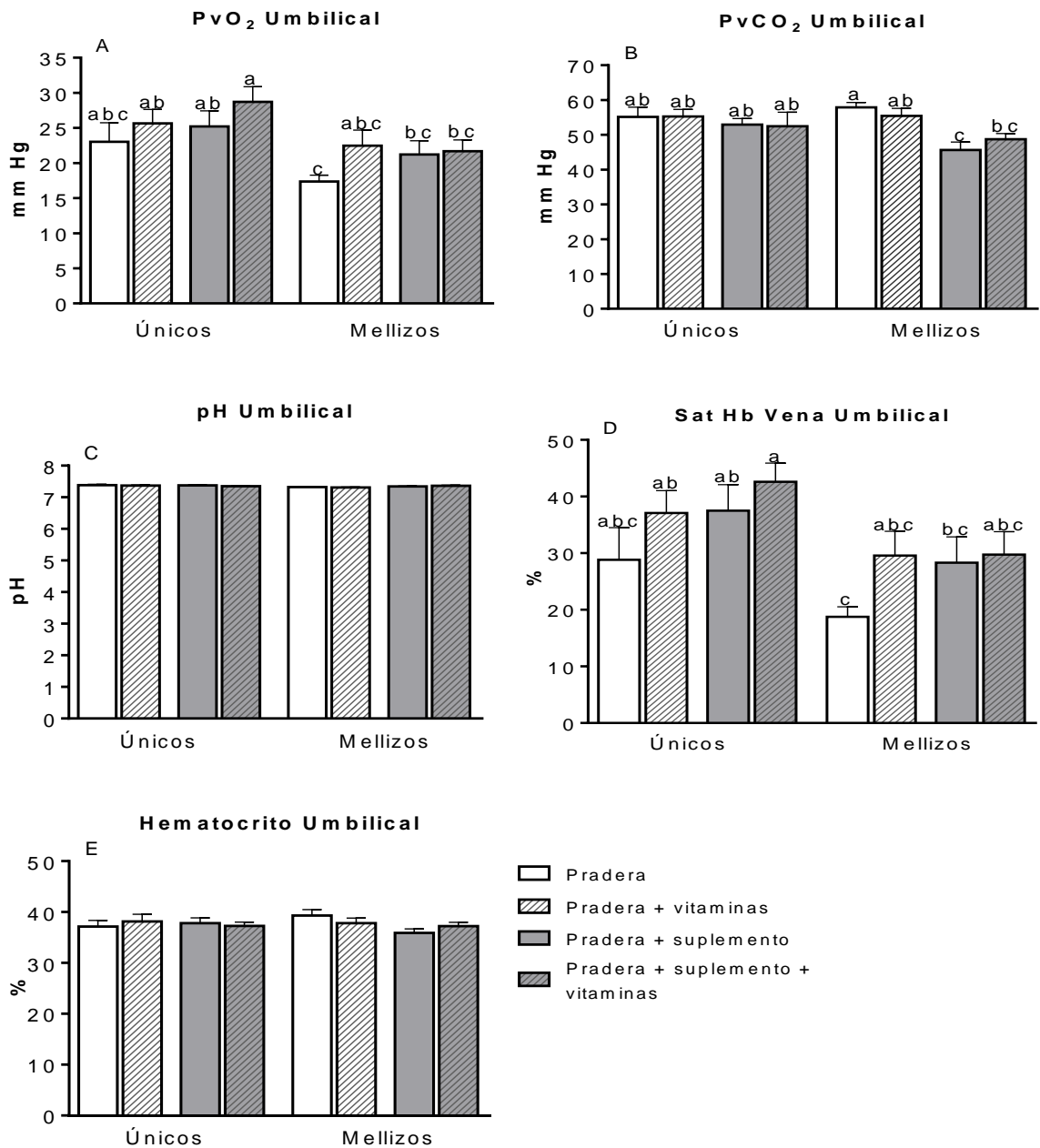


Figura 3: Variables sanguíneas umbilicales relacionadas con el transporte y disponibilidad de O₂ fetal en ovejas con 100 días de gestación, únicas y melliceras, con o sin suplemento nutricional, tratadas o no con vitaminas C y E. Letras distintas en las barras indican diferencias significativas, con $P \leq 0,05$.

Efectos de la administración de vitaminas C y E sobre biomarcadores de estrés oxidativo en sangre venosa umbilical

La Figura 4 muestra que la alimentación resultó ser un factor significativo para la concentración de MDA en la sangre venosa umbilical. Ovejas restringidas nutricionalmente mostraron menores valores de esta variable ($2,23 \pm 0,1 \mu\text{M}$ vs $2,61 \pm 0,1 \mu\text{M}$, respectivamente; $P = 0,002$). En este caso, como se observa en la Figura 4A, todos los grupos de mellizos y los únicos con vitaminas y/o con suplemento nutricional presentaron una concentración significativamente mayor de MDA en comparación con el grupo UP ($P \leq 0,05$). La CAT no fue afectada ni por el número de fetos, ni por el plano nutricional, así como tampoco por la suplementación con vitaminas (Fig. 3B).

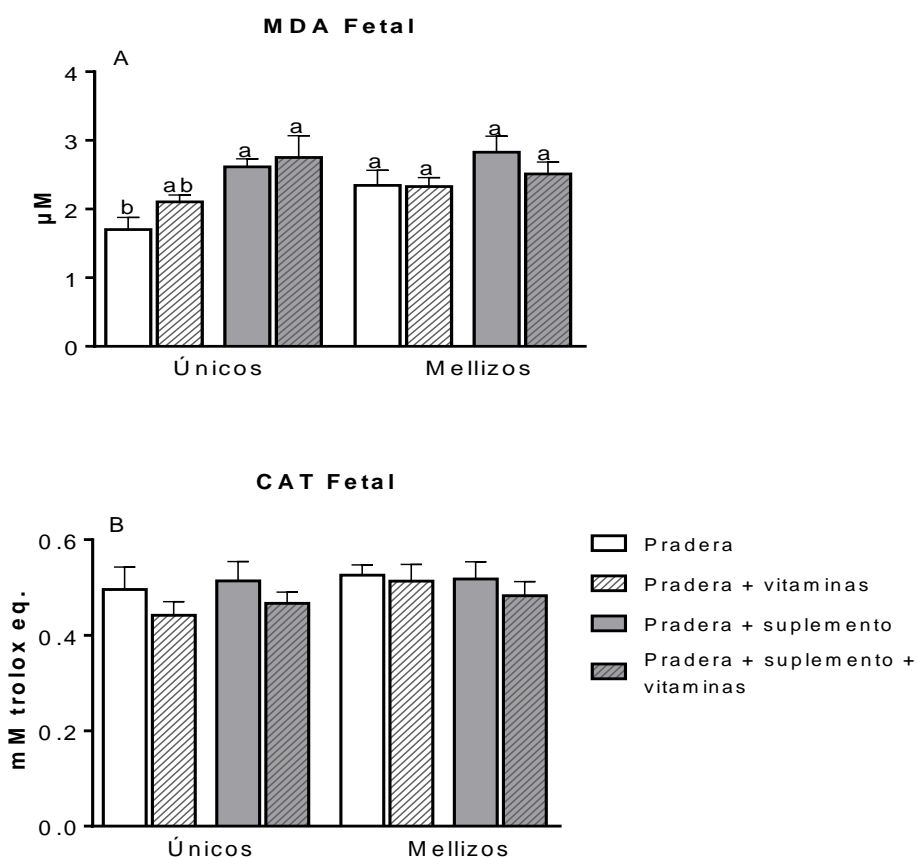


Figura 4: Concentración de MDA y CAT en sangre venosa umbilical de ovejas con 100 días de gestación, únicas y melliceras, con o sin suplemento nutricional, tratadas o no con vitaminas C y E. Letras distintas en las barras indican diferencias significativas, con $P \leq 0,05$.

Efectos de la administración de vitaminas C y E sobre características biométricas fetales.

Las variables de peso fetal, perímetro torácico y largo de pata mostraron un comportamiento similar, ya que, tanto el factor alimentación ($P = <0,001$ para los tres factores) como el número de fetos ($P = <0,001$ para los tres factores) resultaron ser significativos para estas tres variables. En todos estos casos, fetos provenientes de madres con gestación única presentan mayores valores ($1069,19 \pm 29,48$ gr; $21,54 \pm 0,22$ cm; $20,12 \pm 0,2$ cm, respectivamente) al ser comparadas con fetos provenientes de gestaciones melliceras ($955,18 \pm 18,15$ gr; $20,67 \pm 0,15$ cm; $19,29 \pm 0,16$ cm, respectivamente). Así mismo, los fetos cuyas madres recibieron suplementación con concentrado presentaron mayores valores para las tres características ($1066,07 \pm 21,66$ gr; $21,51 \pm 0,18$ cm; $20,12 \pm 0,19$ cm, respectivamente) en comparación con los no suplementados ($930,22 \pm 21,01$ gr; $20,49 \pm 0,17$ cm; $19,09 \pm 0,14$ cm, respectivamente). Como se observa en la Figura 5A, 5B y 5E, en las tres características fetales el mayor valor lo presenta el grupo UPS, mientras que los menores se presentan en los grupos MP y MP+V ($P \leq 0,05$).

La alimentación ($P = 0,01$) y el número de fetos ($P = 0,02$) también resultaron ser factores significativos para la longitud céfalo caudal (Fig. 5C). Los animales con suplementación nutricional y los de gestación única fueron más largos ($27,86 \pm 0,25$ cm; $27,82 \pm 0,34$ cm, respectivamente) que sus contrapartes sin suplementación o con gestación de mellizos ($26,69 \pm 0,24$ cm; $26,95 \pm 0,2$ cm, respectivamente). En este caso, el grupo UPS presentó el mayor valor, siendo distinto a todos los demás grupos ($P \leq 0,05$).

Finalmente, para la característica largo de mano (Fig. 5D), animales suplementados tuvieron valores más altos que aquellos fetos provenientes de madres restringidas nutricionalmente ($17,75 \pm 0,32$ cm vs $16,65 \pm 0,17$ cm, respectivamente; $P = 0,006$). De la misma forma, fetos únicos tuvieron un promedio mayor a aquellos de gestaciones melliceras ($18,02 \pm 0,4$ cm vs $16,72 \pm 0,16$ cm, respectivamente; $P = 0,001$). Como se aprecia en la Figura mencionada, el grupo UPS y UPS+V presentan el promedio más alto, por otro lado, los grupos MP y MP+V presentan los valores más bajos ($P \leq 0,05$).

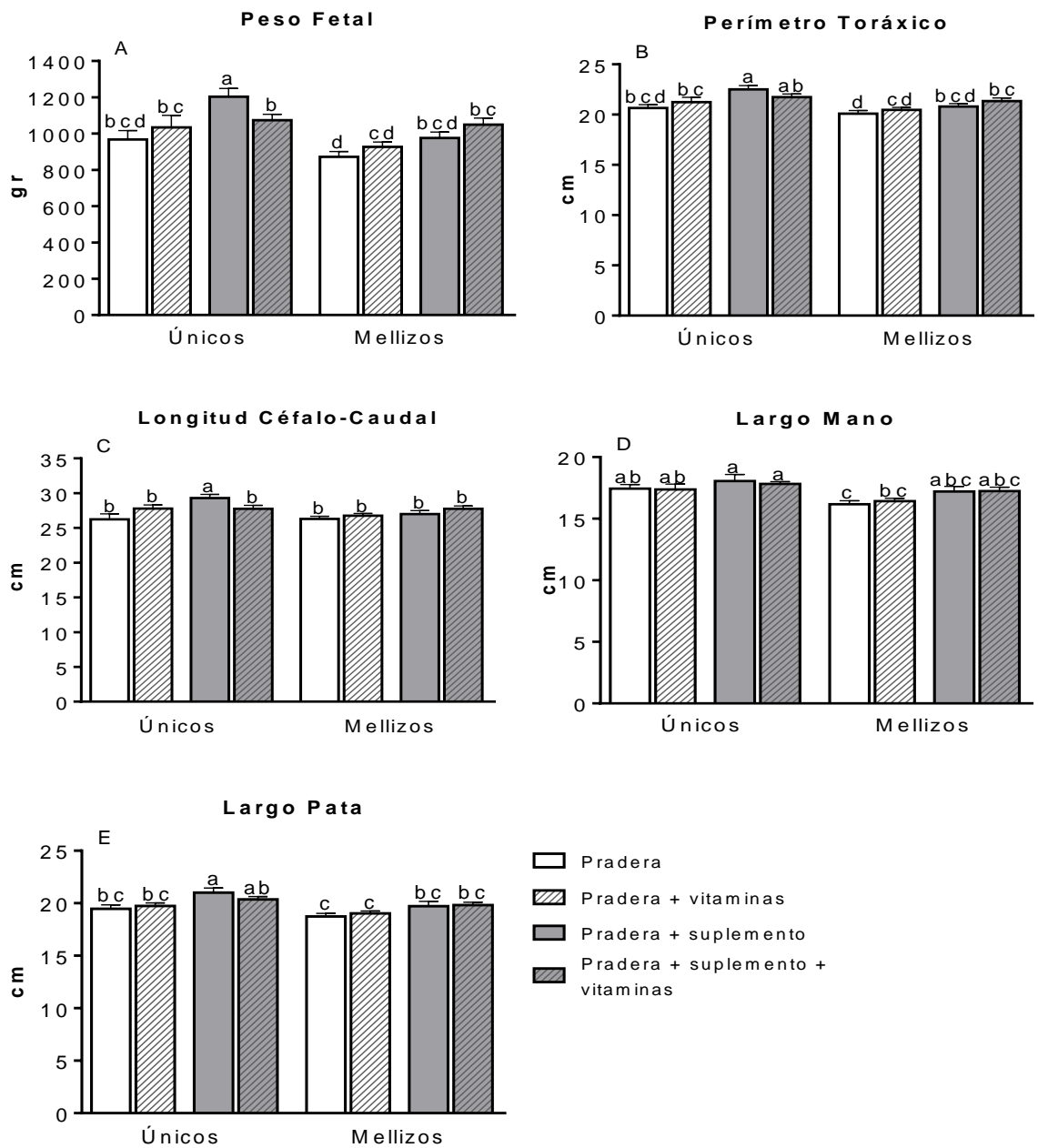


Figura 5: Medidas biométricas fetales de gestaciones ovinas de 100 días, únicas y melliceras, con o sin suplemento nutricional, tratadas o no con vitaminas C y E. Letras distintas en las barras indican diferencias significativas, con $P \leq 0,05$.

DISCUSIÓN

Acorde a la revisión bibliográfica realizada, en la literatura no hay información respecto a hipoxia, estrés oxidativo y terapia antioxidante y sus efectos en ovejas melliceras bajo restricción nutricional. El presente estudio destaca los valores obtenidos tanto a nivel gasométrico fetal (hipoxemia, aumento de PCO_2 y menor saturación de hemoglobina por O_2), como de menores valores biométricos en fetos de madres melliceras y restringidas nutricionalmente, evidenciando una posible sinergia de ambas condiciones en el crecimiento intrauterino durante los dos primeros tercios de la preñez. Pese a lo anterior, si bien la administración de las vitaminas C y E aumentó la disposición y saturación de O_2 a nivel umbilical en este tipo de gestación, su dosificación diaria no logró tener un efecto positivo en la disminución del impacto de la restricción del crecimiento intrauterino ni en los biomarcadores de estrés oxidativo durante los primeros 100 días de gestación.

Peso y condición corporal materna

Dentro de la variación del peso de las ovejas a lo largo de la gestación, resalta la baja inicial de 7 a 8 kg una vez iniciada la investigación. Esto se atribuye a que, por razones de disponibilidad de personal, la implementación de los distintos tratamientos de suplementación tuvo lugar a primera hora de la mañana durante las primeras semanas. Lo anterior significó llevar las ovejas desde el potrero y encerrarlas en un corral, privándolas de poder alimentarse en base a pastoreo durante las primeras 4 horas al día, aproximadamente. En relación con esto, se ha establecido que las primeras horas tras el amanecer serían las de mayor importancia para los animales en términos del volumen ingerido (Hinch, 2017). Es más, diversas experiencias de suplementación estratégica en Magallanes aplican esta lógica, recomendando dar concentrado a los animales después del mediodía, precisamente para que se aproveche al máximo el consumo de forraje y no alterar el patrón de pastoreo normal (Lira, 2012). Asimismo, tras cambiar el manejo de suplementación descrito a horas de la tarde, los pesos de los animales se diferenciaron a medida que avanzó la gestación, según su nivel nutricional. En estudios en que someten a ovejas de similar edad gestacional a dos niveles nutricionales (subnutrida y adecuadamente nutrida) no se evidencia una baja de peso inicial una vez comenzada la investigación como las registradas en esta memoria (Lemley *et al.*, 2012; Sen *et al.*, 2013). Las diferencias se

pueden atribuir a la forma de implementación de los distintos grados nutricionales, ya que, en los estudios mencionados consideraron alteraciones en el peso y condición corporal manteniendo a las ovejas en corrales individuales. Esto permitiría que los animales se alimentaran en horarios constantes durante el día y, por lo tanto, alterando su peso y/o condición corporal de una manera más uniforme. Por otro lado, también se evidencia una mayor caída de peso y de condición corporal en animales no suplementados de todos los grupos en el día 100 de preñez al compararse con las investigaciones citadas. En relación con esto último, hay que considerar que los animales del presente estudio se mantuvieron a potrero, por lo que necesitaban desplazarse para alimentarse, además de movilizarse diariamente hacia el corral de manejos, lo que pudo tener un mayor impacto sobre estas dos variables. Independientemente de lo anterior, investigaciones en la región de Magallanes indican que, desde el encaste hasta aproximadamente el día 107 de gestación de ovejas únicas y melliceras, en condiciones de manejo normales para la zona, el peso disminuye 10 a 15 kg, con una baja de condición corporal de aproximadamente un punto (Sales y Strauch, 2006), lo cual está en línea con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Según lo anterior, también se puede extrapolar que durante el período inicial de la investigación los animales que recibieron suplementación no se encontraban gestando con una nutrición completa, como se preveía. Pese a esto, estudios en que se realimenta para un estatus nutricional óptimo a animales subnutridos durante la gestación temprana-media, han destacado que el crecimiento fetal y placentario se normaliza (Kwon *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2011). Tomando esto en consideración y sumado a que la inadecuada nutrición inicial del grupo suplementado fue de un período breve, se puede concluir que la subnutrición de los grupos no alcanza a ser de una severidad ni duración importante como para haber impactado negativamente los demás resultados.

Variables maternas relacionadas con el transporte de oxígeno

El promedio de las variables maternas involucradas en el transporte de O₂ no tuvo mayor variación, hallándose valores promedio de $86,49 \pm 2,85$ mmHg, $39,45 \pm 0,92$ mmHg, $7,4 \pm 0,01$ y $95,07 \pm 0,59\%$ para el caso de la PaO₂, PaCO₂, pH y Sat Hb, respectivamente. Estos datos no difieren en gran medida de los rangos encontrados en otras investigaciones de

ovejas a nivel del mar (Parraguez *et al.*, 2011; Adachi *et al.*, 2004), a excepción de una pequeña disminución de la PaO₂. Esta leve disminución se puede atribuir a la posición decúbito dorsal en que se mantuvieron las ovejas antes de la toma de muestra. Referente a esto último, datos de Walther *et al.* (2005) indican que la posición supina disminuye la PaO₂, además de no haber cambios en la PCO₂ (Walther *et al.*, 2005). Asimismo, Ismail *et al.*, (2009) midió la PaO₂, PaCO₂ y pH sanguíneo de ovejas en decúbito lateral, encontrando promedios similares a los encontrados en esta memoria (Ismail *et al.*, 2009). La leve disminución de la oxigenación materna tiene impacto en las variables gasométricas fetales, lo cual será discutido en su correspondiente capítulo.

Por otro lado, la diferencia del hematocrito según nivel nutricional probablemente se deba a la mejor disposición de proteínas y hierro en el caso de los animales que recibieron suplemento alimenticio. De todos modos, cabe resaltar que los promedios se encuentran dentro de los rangos fisiológicos normales para la especie (Cebra y Cebra, 2012), además de poseer diferencias mínimas (aproximadamente de un 2,7% entre suplementados y no suplementados), por lo cual no sería un factor influyente en la capacidad de transporte de oxígeno entre los grupos.

VARIABLES FETALES RELACIONADAS CON EL TRANSPORTE DE OXÍGENO

Existe muy poca información respecto de la medición de gases sanguíneos en fetos ovinos a los 100 días de gestación o edades gestacionales cercanas. Sin embargo, nuestros resultados muestran valores de PvO₂, PvCO₂, pH y Sat Hb menores que los registrados por Rurak y Bassette (2013). Lo anterior se podría deber a que la investigación citada realizó la toma de muestra con fetos cateterizados y bajo condiciones de mínimo estrés. Por nuestro lado, aunque se pretende alterar lo menos posible los gases fetales mediante la realización de una rápida cesárea, vemos que la posición decúbito dorsal de la madre afecta, aunque levemente, el intercambio gaseoso materno-fetal. Además, hay que considerar el efecto del uso de anestesia sobre estas variables. En relación con esto, otros estudios en etapas más avanzadas de gestación han demostrado que la medición de estos parámetros fetales cambia de manera similar a lo reportado en este estudio bajo anestesia con ketamina (Strümper *et al.*, 2004) y bajo inconsciencia con otros anestésicos (Loughran *et al.*, 2017),

presuntamente debido a la disminución de la respiración espontánea materna a lo largo de la cirugía. Para el caso del hematocrito fetal, nuestros valores son similares a los encontrados en otras investigaciones (Loughran *et al.*, 2017; Musk y Kemp, 2015).

Por otro lado, se destaca que la subnutrición y la gestación mellicera condicionan los índices respecto a la disponibilidad de O₂. Es más, fetos provenientes de gestaciones melliceras bajo subnutrición obtienen un promedio de $17,36 \pm 1,61$ mmHg en su PvO₂ y de $18,75 \pm 3,4\%$ en la Sat Hb, por lo cual es plausible concluir que estas gestaciones ocurren bajo franca hipoxia. Lo anterior se podría explicar por la existencia de una insuficiencia placentaria en los grupos. Lamentablemente, en esta memoria no se consideraron variables relacionadas con la placenta para realizar una mejor interpretación. Pese a lo anterior, características de insuficiencia placentaria se han descrito en gestaciones bajo subnutrición o gestaciones múltiples (Igwebuiké, 2010; Gootwine *et al.*, 2007; Sen *et al.*, 2013; Virrenga *et al.*, 2004), por lo cual, se afectaría el correcto intercambio de gases materno-fetal, destacándose especialmente el grupo poseedor de ambas características (MP), ya que obtiene los peores valores de oxigenación, posiblemente por la sinergia del efecto de ambas condiciones.

Las concentraciones plasmáticas de la vitamina E dependen fundamentalmente de la alimentación. Por el contrario, ha sido un tema controversial el hecho de la suplementación diaria de vitamina C en rumiantes, ya que estos son capaces de sintetizarla y satisfacer sus necesidades diarias. En relación con lo anterior, estudios han demostrado que la suplementación diaria de estas vitaminas en ovejas preñadas durante largos períodos aumenta sus concentraciones plasmáticas (Capper *et al.*, 2005; Kasimanickam *et al.*, 2012; Parraguez *et al.*, 2011), siendo prudente relacionar, entonces, que se aumenta el traspaso de estos nutrientes hacia el compartimento feto-placentario. De esta manera, la suplementación con vitaminas C y E mostraron una tendencia a aumentar la PvO₂ y la Sat Hb por O₂ en la vena umbilical, especialmente en las preñeces de mellizos, aunque las diferencias no lograron significación estadística, probablemente debido al pequeño número muestral y al diseño estadístico empleado. Thakor *et al.* (2010) demostró que la administración de vitamina C aumenta el flujo sanguíneo umbilical en ovejas en el último tercio de preñez

(Thakor *et al.*, 2010). Sumado a esto, otros estudios han demostrado que la administración de vitamina E estimula el proceso de angiogénesis placentaria en la preñez tardía (Kasimanickam *et al.*, 2010; Kasimanickam *et al.*, 2012). Según los presentes resultados se puede especular que tales efectos podrían haber estado presentes en nuestro estudio, favoreciendo la mejora en la suplementación de O₂ a los fetos. Lo anterior adquiere mayor sentido si se considera que las alteraciones morfológicas de los placentomas (angiogénesis y vasodilatación) para las demandas crecientes del feto, tienen lugar durante los últimos dos tercios de preñez (Gootwine *et al.*, 2007). Aun así, se requieren más estudios para lograr concluir al respecto.

Como se mencionó en la revisión bibliográfica, la condición de hipoxia genera normalmente un aumento en la generación de EROS y por consiguiente estrés oxidativo. Pese a esto, fetos provenientes de gestaciones melliceras y/o bajo subnutrición no mostraron un alza en los biomarcadores de estrés oxidativo, aún cuando registran peores condiciones en su oxigenación. Asimismo, la administración de vitaminas antioxidantes C y E mejora las características de oxigenación, también sin cambios en las concentraciones del MDA. Lo anterior se podría deber a la edad gestacional en que se midieron las variables, ya que, a este momento los requerimientos de oxígeno feto-placentario son aún bajos, aumentando hasta un 50% en la gestación tardía (Vaughan y Fowden, 2016), razón por la cual, pese a que exista un ambiente con una menor PvO₂, las necesidades de fetales de oxígeno parecieran estar parcial o totalmente suplidas, por ende tampoco se presenta estrés oxidativo. Por su lado, considerando que fetos mellizos bajo subnutrición sí se encuentran en condiciones hipóxicas, es posible que en estos casos la capacidad antioxidante endógena sea suficiente para contrarrestar sus efectos. Sin embargo, llama la atención que exista un alza en la medición del MDA en ovejas adecuadamente nutridas, sin variaciones en la CAT. Una posible explicación para esto radicaría en los fenómenos de diferenciación y crecimiento celular, caracterizados por ser altamente demandantes de ATP mitocondrial (He *et al.*, 2016). En relación esto, se describe que el anión superóxido, uno de los radicales libres más relevantes, se produce en un 1-2% del total de O₂ consumido para la generación de ATP (Kim *et al.*, 2005). Dado lo anteriormente expuesto, se puede sospechar que se aumentó la producción de radicales libres con condiciones de oxigenación

normales, probablemente debido a una mayor síntesis de ATP. Lo anterior cobra mayor sentido si, por ejemplo, se toma en consideración que el grupo UPS obtuvo uno de los valores más alto en el MDA, además de mayor peso y tamaño fetal. Es decir, gracias a una adecuada nutrición el feto logró la mayor generación de ATP para crecer adecuadamente, trayendo consigo un aumento en la producción de radicales libres, reflejado en los niveles del MDA.

Por otro lado, no se ha encontrado información para entender la ausencia de diferencias en la CAT según el tipo de gestación, grado de nutrición o la administración de vitaminas antioxidantes, aunque debido a que no se aprecia un aumento del estrés oxidativo como tal, es esperable que la capacidad antioxidante se mantenga sin variación. Sumado a esto, en el caso de la suplementación con vitaminas C y E, ya que sí lograron un efecto en mejorar los niveles de oxígeno sin variar la CAT, es presumible que generaron su efecto antioxidante tempranamente en el compartimento feto-placentario, reduciéndose e impidiendo detectar variaciones de la capacidad antioxidante en la sangre fetal entre los grupos.

Características morfométricas fetales

Tanto la subnutrición como la gestación mellicera resultaron ser factores que afectaron negativamente el crecimiento fetal. Esto se debería a que ambos factores pueden conducir a insuficiencia placentaria, como se ha descrito con anterioridad, disminuyendo la entrega de nutrientes y oxígeno hacia el organismo en desarrollo. Además, el grupo MP, poseedor de ambas condiciones, es el grupo con mayor grado de IUGR. Lo último es consistente con lo reportado por Rumball *et al.* (2008), quienes encontraron que los mellizos se ven más afectados en su normal crecimiento fetal bajo condiciones de subnutrición (Rumball *et al.* 2008). Presuntamente lo anterior se deba a un efecto sinérgico que tendría la gestación mellicera y la subnutrición en el grado de insuficiencia placentaria, afectando aún más el normal crecimiento intrauterino.

Para el caso de la administración de las vitaminas antioxidantes, éstas no tuvieron efecto en aumentar las características biométricas fetales. Esto difiere con el estudio de Parraguez *et al.* (2011), en donde se logró disminuir la brecha del peso entre corderos nacidos en altura

(bajo efecto de hipoxia hipobárica y estrés oxidativo) en relación con los nacidos al nivel del mar (Parraguez *et al.*, 2011). Las diferencias encontradas se pueden deber a que en el presente caso, como ya se ha discutido, no existiría una hipoxia fetal ni la consecuente generación de estrés oxidativo que esté afectando el normal desarrollo fetal. Además, se debe considerar que tampoco hubo un aumento en la CAT fetal. Por otro lado, la medición del estudio citado se realizó al término de la gestación y, tomando en consideración que en la presente memoria los factores de subnutrición y preñez múltiple disminuye la PvO₂ al día 100 de preñez, es posible que a medida que avance la gestación y aumente la demanda de O₂ por parte del feto se produzca un verdadero estado hipóxico y una consecuente generación de estrés oxidativo, por lo cual la administración diaria de las vitaminas C y E sí podría lograr a esta edad gestacional un efecto positivo en el crecimiento fetal, obteniendo resultados consistente con la investigación citada.

Dado que se discute que existe una adecuada entrega de oxígeno para las demandas fetal, se cree que la disminución en la entrega de otros nutrientes es la responsable de las diferencias en el crecimiento fetal entre los grupos. Asimismo, dentro de la disminución en la entrega de nutrientes al feto, se destaca que la hipoglicemia y la menor disposición de aminoácidos afectan las concentraciones plasmáticas fetales de los factores de crecimiento insulínico 1 y 2 (IGF-1 y IGF-2, por sus siglas en inglés), moléculas que corresponden a los principales reguladores endocrinos en el crecimiento fetal (Herrera *et al.*, 2014), lo cual podría corresponder a la vía de mayor importancia afectando el desarrollo de los fetos en los distintos grupos del estudio. Aun así, ya que en la presente memoria no se midieron características de suficiencia placentaria asociado al traspaso de otros metabolitos, resulta difícil discernir concretamente que mecanismo puede estar asociado en la presentación de la IUGR.

CONCLUSIONES

Tomando en consideración lo expuesto en la presente memoria, se puede concluir que la gestación mellífera y la subnutrición materna contribuyen a la presentación de menor aporte de O₂ al feto y a la restricción del crecimiento intrauterino en los primeros dos tercios de la preñez ovina, resultados que son más importante en gestaciones donde se suma el efecto de los dos factores. Sin embargo, a pesar del reducido aporte de O₂ no se encontró estrés oxidativo, por lo que la disminución en la entrega de otros nutrientes sería el principal responsable en la disminución del tamaño y peso de los fetos. Por último, la administración de vitaminas antioxidantes C y E únicamente mejora las condiciones de oxigenación, sin embargo, debido a que no existe estrés oxidativo que pudiera afectar el normal desarrollo fetal, no se logra un efecto luego de una administración diaria sobre la disminución del crecimiento intrauterino a esta edad gestacional.

BIBLIOGRAFÍA

ADACHI, K.; UMEZAKI, H.; KAUSHAL, K.M.; DUCSAY, C.A. 2004. Long-term hypoxia alters ovine fetal endocrine and physiological responses to hypotension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:209–217.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. 2010. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrino* 3:1-28.

BELTRÁN, I.; ALOMAR, D. 2011. Subnutrición en gestación temprana en ovinos: Impacto de largo plazo en las crías. *Agro Sur* 39:115-124.

CAPPER, J.L.; WILKINSON, R.G.; KASAPIDOU, E.; PATTINSON, S.E.; MACKENZIE, A.M. 2005. The effect of dietary vitamin E and fatty acid supplementation of pregnant and lactating ewes on placental and mammary transfer of vitamin E to the lamb. *Br J Nutr* 93:549-57.

CEBRA, C.; CEBRA, M. 2012. Diseases of the hematologic, immunologic, and lymphatic systems (multisystem diseases). **In:** Pugh, D.G.; Baird, A.N. (Eds.). *Sheep and goat medicine*. 2^a ed. Elsevier. Misura, USA. pp. 466-502.

CÓRDOVA-IZQUIERDO, A.; RUIZ LANG, C.G.; CÓRDOVA-JIMÉNEZ, C.A.; CÓRDOVA-JIMÉNEZ, M.S.; GUERRA LIERA, J.E.; RODRIGUEZ DENIS, B.E.; ARANCIBIA SALINAS, K. 2009. Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Rev Complut Cienc Vet* 3:1-38.

GARREL, C.; FOWLER, P.A.; AL-GUBORY, K.H. 2010. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. *J Endocrinol* 205:107-116.

GIUSSANI, D.A.; SALINAS, C.E.; VILLENA, M.; BLANCO, C.E. 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* 81:393-398.

GOOTWINE, E.; SPENCER, T.; BAZER, F. 2007. Litter-size-dependent intrauterine growth restriction in sheep. *Animal* 1:547-564.

HE, C.; HART., P.C.; GERMAIN, D.; BONINI, M.G. 2016. SOD2 and the mitochondrial UPR: partners regulating cellular phenotypic transitions. *Trends Biochem Sci* 41:568–577.

HERRERA, A.; KRAUSE, B.; EBENSPERFER, G.; REYES, R.; CASANELLO, P.; PARRA-CORDERO, M.; LLANO, A. 2014. The placental pursuit for an adequate oxidant balance between them other and the fetus. *Front Pharmacol* 5:1-10.

HINCH, G.N. 2017. Understanding the natural behaviour of sheep. **In:** Ferguson, D.M.; Lee, C.; Fisher, A. (Eds.). *Advances in sheep welfare*. Elsevier. Duxford, Reino Unido. pp. 3-17.

IGWEBUIKE, U.M. 2010. Impact of maternal nutrition on ovine foetoplacental development: A review of the role of insulin-like growth factors. *Anim Reprod Sci* 121:189-196.

ISMAIL, Z.B.; JAWASREH, K.; AL-MAJALI, A.A. 2009. Effect of xylazine–ketamine–diazepam anesthesia on certain clinical and arterial blood gas parameters in sheep and goats. *Comp Clin Pathol* 19:11–14.

KASIMANICKAM, R.K.; KASIMANICKAM, V.R.; RODRIGUEZ, J.S.; PELZER, K.D.; SPONENBERG, P.D.; THATCHER, C.D. 2010. Tocopherol induced angiogenesis in placental vascular network in late pregnant ewes. *Reprod Biol Endocrinol* 8:86-96.

KASIMANICKAM, R.K.; KASIMANICKAM, V.R.; HALDORSON, G.J.; TIBARY, A. 2012. Effect of tocopherol supplementation during last trimester of pregnancy on mRNA abundances of interleukins and angiogenesis in ovine placenta and uterus. *Reprod Biol Endocrinol* 10:4-11.

KIM, A.; MURPHY, M.P.; OBERLEY, T.D. 2005. Mitochondrial redox state regulates transcription of the nuclear-encoded mitochondrial protein manganese superoxide dismutase: a proposed adaptive response to mitochondrial redox imbalance. *Free Radic Biol Med* 38:644– 654.

KWON, H.; FORD, S.P.; BAEZER, F.W.; SPENCER, T.E.; NATHANIELSZ, P.W.; NIJLAND, M.J.; HESS, B.W.; WU, G. 2004. Maternal nutrient restriction reduces concentrations of amino acids and polyamines in ovine maternal and fetal plasma and fetal fluids. *Biol Reprod* 71:901-908.

LEMLEY, C.O.; MEYER, A.M.; CAMACHO, L.E.; NEVILLE, T.L.; NEWMAN, D.J.; CATON, J.S.; VONNAHME, K.A. 2012. Melatonin supplementation alters uteroplacental hemodynamics and fetal development in an ovine model of intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302:454-467.

LIRA, R. 2012. Suplementación estratégica In: Strauch, O.; Lira, R. Bases para la producción ovina en Magallanes. INIA Kampenaike. Punta Arenas, Chile pp. 92-103.

LOUGHRAN, C.M.; KEMP, M.W.; MUSK, G.C. 2017. Maternal and fetal arterial blood gas data in normotensive, singleton, isoflurane anesthetized sheep at 124–126 days of gestation. *Can J Vet Res* 81:231–234.

MA, Y.; ZHU, M.J.; UTHLAUT, A.B; NIJLAND, M.J.; NATHANIELSZ, P.W.; HESS, B.W.; FORD, S.P. 2011. Upregulation of growth signaling and nutrient transporters in cotyledons of early to mid-gestational nutrient restricted ewes. *Placenta* 32:255-263.

MORRISON, J. 2008. Sheep models of intrauterine growth restriction: fetal adaptations and consequences. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35:730–743.

MUSK, G.C.; KEMP, M.W. 2015. Maternal and fetal arterial blood gas data during general anaesthesia for caesarean delivery of preterm twin lambs. *Lab Anim* 50:198-203.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2007. Nutrient Requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids. National Academy of Sciences. Washington DC, USA 362 p.

PARRAGUEZ, V.H; ATLAGICH, M; ARANEDA, O; GARCÍA, C.; MUÑOZ, A.; DE LOS REYES, M.; URQUIETA, B. 2011. Effects of antioxidant vitamin on newborn and placental traits in gestations at high altitude: comparative study in high and low altitude native sheep. *Reprod Fertil Dev* 23:285-296.

RABADÁN-DIEHL, C.; NATHANIELSZ, P. 2013. From mice to men: research model developmental programming. *J Dev Orig Health Dis* 4:3-9.

RUMBALL, C.W.H.; HARDING, J.E.; OLIVER, M.H.; BLOOMFIELD, F.H. 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.

RURAK, D.; BESSETTE, W. 2013. Changes in fetal lamb arterial blood gas and acid-base status with advancing gestation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304:908–916.

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.; STRAUCH, O. 2006. Efecto del tipo de preñez sobre la variación de peso invernal en ovejas. **In:** XXXI Congreso anual de la sociedad chilena de producción animal. Chillán, Chile. 18-20 mayo 2006. Sociedad chilena de producción animal (SOCHIPA A.G.). pp. 151-152.

SARASWAT, S.; KHARCHE, S.; JINDAL, S. 2014. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: A balancing act between beneficial and detrimental effects. *Iran J Appl Anim Sci* 4:247-255.

SEN, U.; SIRIN, E.; KURAN, M. 2013. The effect of maternal nutritional status during mid-gestation on placental characteristics in ewes. *Anim Reprod Sci* 137:31– 36.

SHARMA, R.K.; BLAIR, H.T.; JENKINSON, C.M; KENYON, P.R.; COCKREM, J.F.; PARKINSON, T.J. 2012. Uterine environment as a regulator of birth weight and body dimension on newborn. *J Anim Sci* 90:1338-1348.

STRÜMPER, D.; GOGARTEN, W.; DURIEUX, M.E.; HARTLEB, K.; VAN AKEN, H.; MARCUS, M.A. 2004. The effects of S(+)-ketamine and racemic ketamine on uterine blood flow in chronically instrumented pregnant sheep. *Anesth Analg* 98:497–502.

THAKOR, A.S.; HERRERA, E.A.; SERÓN-FERRÉ, M.; GIUSSANI, D.A. 2010. Melatonin and vitamin C increase umbilical blood flow via nitric oxide-dependent mechanisms. *J Pineal Res* 49:399–406.

VAUGHAN, O.R.; FOWDEN, A.L. 2016. Placental metabolism: substrate requirements and the response to stress. *Reprod Dom Anim* 51:25–35.

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.

WALTHER, S.M.; JOHANSSON, M.J.; FLATEBO, T.; NICOLAYSEN, A.; NICOLAYSEN, G. 2005. Marked differences between prone and supine sheep in effect of PEEP on perfusion distribution in zone II lung. *J Appl Physiol* 99:909–914.

ANEXOS

Certificado Bioética



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

Santiago, 14 de junio de 2016

CERTIFICADO N° 11-2016

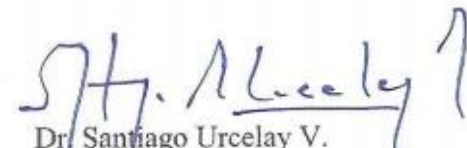
En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, y teniendo a la vista la metodología del Proyecto: **“Roles of hypoxia and oxidative stress on lamb fetal growth restriction by twin pregnancy and/or undernutrition: intervention with antioxidants”**. Este comité entiende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




Dr. Santiago Urcelay V.
Presidente
Comité de Bioética Animal

