



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Trabajo Final presentado para optar al Grado de Médico Veterinario

**EFFECTOS DE LA DESNUTRICIÓN MATERNA DURANTE EL
FINAL DE LA GESTACIÓN EN LA HISTOLOGÍA DE LOS
ÓRGANOS REPRODUCTIVOS DE LAS CORDERAS**

Alumno: Vitali, Sofía Rosario

DNI: 36.632.298

Director: Rabaglino, María Belén

Río Cuarto – Córdoba

Febrero 2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final

*Efectos de la desnutrición materna durante el final de la gestación en la
histología de los órganos reproductivos de las corderas neonatales*

Autor: Sofía Rosario Vitali - DNI: 36.632.298

Director: María Belén Rabaglino - DNI: 27.185.339

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión
Evaluadora:

Fecha de Presentación: ____/____/____

Secretario Académico

ÍNDICE

Resumen	VI
Summary	VII
Capítulo I Introducción y Antecedentes	8
Hipótesis	11
Objetivo general y objetivos específicos	11
Capítulo II Materiales y métodos	12
Animales	12
Toma de muestras	12
Medición de metabolitos sanguíneos	13
Histología.....	13
Análisis estadístico.....	14
Capítulo III Resultados	15
Concentraciones sanguíneas de glucosa en ovejas madres	15
Concentraciones sanguíneas de IGF-1 en ovejas madres	16
Concentraciones sanguíneas de estrógenos en ovejas madres	16
Concentraciones sanguíneas de glucosa en corderas	17
Concentraciones sanguíneas de IGF-1 en corderas.....	18
Concentraciones sanguíneas de estrógenos en corderas	19
Peso de los órganos reproductivos a los 60 días de vida.....	20
Histología ovárica	21
Histología uterina.....	22
Capítulo IV Discusión	24
Capítulo V Conclusiones	28
Bibliografía	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Peso promedio de los órganos reproductivos en corderas nacidas de madres restringidas nutricionalmente al final de la gestación o de madres controles	20
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Niveles promedio de glucosa sanguínea en ovejas preñadas alimentadas al 100% (Controles o "C") o al 50% (Restringidas o "R") de los requerimientos durante el último mes de gestación	15
Figura 2: Concentraciones sanguíneas de estradiol durante la semana previa al parto de ovejas alimentadas al 100% (Controles o "C") o al 50% (Restringidas o "R") de los requerimientos durante el último tercio de la gestación	16
Figura 3: Niveles promedio de glucosa sanguínea en corderas nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el último tercio de gestación (Restringidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C")	17
Figura 4: Niveles promedio de IGF-1 sanguíneos en corderas nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el último tercio de gestación (Restringidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C")	18
Figura 5: Concentraciones sanguíneas de estradiol obtenidas a los 50 días de vida de corderas nacidas de madres alimentadas al 100% (Controles o "C") o al 50% (Restringidas o "R") durante el último tercio de gestación.	19
Figura 6: Diámetros promedios de folículos (secundarios y terciarios) ováricos en corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el último tercio de gestación (Restringidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C")... ..	21
Figura 7: Número promedio de glándulas endometriales en corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el último tercio de gestación (Restringidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C")... ..	23

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1: Fotografía de útero de corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el último tercio de la gestación (Restringidas) o nacidas de madres alimentadas al 100% (Controles).....	20
Ilustración 2: Imágenes de cortes histológicos de ovario de corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el último tercio de gestación (Restringidas) o alimentadas al 100% (Controles).....	22
Ilustración 3: Imágenes de cortes histológicos de úteros de corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el último tercio de gestación (Restringidas) o alimentadas al 100% (Controles).....	23

RESUMEN

Las características biológicas y reproductivas de las ovejas y los sistemas de producción extensivos de la Argentina predisponen a que las ovejas preñadas lleven a cabo el último tercio de la gestación a fines del invierno, cuando hay escasa disponibilidad forrajera. Durante este período gestacional hay una gran demanda de nutrientes, producto del crecimiento exponencial de lo/s feto/s, por lo que es muy común que las ovejas se encuentren bajo condiciones de deficiencias nutricionales (balance energético negativo o BEN) y deban hacer uso de sus reservas corporales. Por ello, el concepto de "programación fetal" hace referencia a etapas gestacionales en los que el desarrollo fetal puede verse comprometido, resultando en cambios fisiológicos en el feto que se ponen de manifiesto cuando el animal es adulto.

Con el objetivo de correlacionar el efecto de la desnutrición materna durante la última etapa de la gestación con la futura performance reproductiva de las crías, se realizó un estudio utilizando ovejas en el último tercio de gestación, las cuales se dividieron al azar en dos grupos: restringidas ("R") y controles ("C"), siendo alimentadas con el 50% y 100% respectivamente de sus requerimientos nutricionales, con el fin de evaluar las concentraciones de glucosa (GLU) e IGF-1 (factor de crecimiento insulínico 1) en plasma de ovejas madres e hijas y determinar el desarrollo histológico de ovarios y útero de corderas sacrificadas a los 60 días de vida.

A partir de este estudio se puede afirmar que restricciones nutricionales en el último tercio de gestación producen alteraciones en los niveles sanguíneos de GLU y de IGF-1 en ovejas que pueden afectar el desarrollo de órganos reproductivos de sus crías. Los niveles de GLU e IGF-1 en las corderas se vieron fuertemente afectados durante los primeros días (GLU) y primeras semanas (IGF-1) posteriores al parto, lo que alteraría la foliculogénesis ovárica y el desarrollo de las glándulas uterinas durante los primeros 2 meses de vida. En consecuencia, las corderas nacidas de las ovejas en el grupo "R" muestran un útero más inmaduro que las corderas nacidas de las ovejas en el grupo "C", a una edad en la que el útero ya tiene que estar histológicamente desarrollado. Esto haría suponer que la fertilidad de las crías durante la vida adulta estaría comprometida, con menores tasas de preñez y aumento en los porcentajes de pérdidas embrionarias/fetales.

Palabras claves: balance energético negativo, oveja preñada, programación fetal, glucosa, IGF-1, desarrollo histológico, ovarios, útero.

SUMMARY

The biological and reproductive characteristics of the sheep plus the extensive production systems of Argentina predispose to the pregnant ewe to undergo the last third of the gestation during late winter, with low forage availability. During this gestational period there is a great demand for nutrients, due to the exponential growth of the fetus, so it is very common for the sheep to be under nutritional deficiencies (negative energy balance or BEN). The concept of "fetal programming" refers to gestational stages in which fetal development may be compromised, resulting in physiological changes in the fetus that could have consequences in the adult animal.

With the objective of correlating the effect of maternal undernutrition during the last stage of gestation with the future reproductive performance of the offspring, a study was carried out using late pregnant ewes. These animals were randomly divided into two groups: restricted ("R") and controls ("C"), and were fed with 50% or 100%, respectively, of their nutritional requirements. Plasma glucose (GLU) and IGF-1 concentrations were evaluated in mothers and daughter lambs and the histological development of ovary and uterus of lambs was determined at 60 days of age.

Results from this study corroborate that nutritional restrictions in the last third of gestation produce alterations in the blood levels of GLU and IGF-1 in the ewe that can affect the development of reproductive organs of their offspring. GLU and IGF-1 levels in lambs were strongly affected during the first days (GLU) and first weeks (IGF-1) postpartum, which would alter ovarian folliculogenesis and uterine gland development during the first 2 months of life. Consequently, lambs born from ewes in the "R" group showed a more immature uterus than lambs born from ewes in the "C" group, at an age when the uterus should have completed the histological development. These results suggest that the fertility of the offspring during adulthood could be compromised, with lower pregnancy rates and increased rates of embryo / fetal losses.

Key words: negative energy balance, pregnant ewe, fetal programming, glucose, IGF-1, histological development, ovaries, uterus.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La importancia de la producción ovina en nuestro país ha ido en aumento durante los últimos años ya que varios factores han fortalecido la comercialización tanto de la lana como de la carne (Vila Moret, 2012). La mayoría de los rebaños se crían en sistemas con pastizales naturales, sin suplementación o con un nivel bajo de la misma. Por lo tanto, cuando los requerimientos de energía aumentan durante la gestación o lactancia, y la energía proporcionada en la dieta no es suficiente para cubrir estos requerimientos, el animal entra en balance energético negativo. Esto no sólo afecta al estado metabólico de la madre sino también impacta sobre el desarrollo fetal. Las restricciones nutricionales durante la vida fetal tiene consecuencias negativas permanentes, incluido el futuro desempeño reproductivo (Wu et al.2006).

La desnutrición puede ser uno de los principales problemas de las producciones ovinas ya que el pastoreo es la principal fuente de alimento y es usual que la calidad de los forrajes sea pobre principalmente durante las estaciones invernales. El balance energético negativo durante la gestación dispara mecanismos adaptativos para sostener el crecimiento fetal con consecuencias metabólicas en la madre, incluyendo hipoglucemia, hipoinsulinemia y la supresión de la liberación del factor de crecimiento tipo insulínico 1 en plasma (Scaramuzzi et al.,2006). Este efecto también se verá en el feto ya que la restricción en la dieta compromete la funcionalidad de la placenta, lo que resulta en una menor tasa de transferencia de nutrientes al mismo (Wu et al.,2006), llevando a hipoglucemia e hipoinsulinemia fetal y menores niveles de IGF-1, el cual a su vez en el feto ovino es regulado por los niveles de glucosa (GLU) (Edwards y McMillen, 2001; Yuen y col., 2002 ; Oliver y col., 1993).

El concepto de programación fetal establece que influencias adversas durante el desarrollo fetal se traducen en cambios fisiológicos permanentes en el feto que se ponen de manifiesto cuando el animal es adulto (de Boo y Harding, 2006). Restricciones nutricionales durante la vida fetal tiene impactos negativos sobre la supervivencia neonatal y posnatal, en la eficiencia de utilización del alimento, en la salud, en la calidad de la carne y en el rendimiento reproductivo.

Varios estudios han demostrado el efecto detrimental de la desnutrición materna sobre el desarrollo ovárico de las crías (Ying y col., 2013; Hernandez-Medrano y col., 2012; Lea y col., 2006; Rae y col., 2002). Sin embargo, pocos estudios han analizado el efecto de la desnutrición materna durante la gestación sobre el desarrollo uterino del feto, aunque se ha demostrado que corderas que nacen con bajo peso tendrán menor número de carúnculas uterinas que afectaría el crecimiento de la placenta (Aitken et al., 2003).

La desnutrición materna en la gestación temprana hace que las hijas nazcan con ovarios con menor reserva folicular, mientras que la desnutrición a mitad y fines de la gestación (día 50-135) produce una disminución en la proliferación celular de folículos primordiales, secundarios y antrales, células del estroma y vasos sanguíneos en los ovarios fetales (Grazul-Bilska et al., 2009).

El desarrollo uterino se inicia entre los 34 y 55 días de la gestación, a través de la fusión de los conductos paramesonéfricos para dar un útero bicorne con un pequeño cuerpo y un único cuello uterino; y a los 90 días se forman nódulos aglandulares en el endometrio para convertirse en carúnculas. El desarrollo de las glándulas endometriales comienza como invaginaciones poco profundas entre el día 135 y 150 (Wiley y col., 1987), completándose luego del nacimiento entre los días 1 y 7 postnatal.

El crecimiento uterino es independiente de los factores ováricos hasta el día 14 posnatal, luego esteroides y otros factores secretados por el ovario regulan las glándulas endometriales, la morfogénesis y el crecimiento global del útero. A los 56 días posnacimiento, el tejido caruncular y las áreas de endometrio intercaruncular son histológicamente similares a los del útero adulto (Taylor y col., 2000).

En los rumiantes, si bien la mayor parte del desarrollo y crecimiento uterino tiene lugar durante la gestación tardía y después del nacimiento, en el endometrio fetal se expresan receptores para los factores de crecimiento tipo insulínicos 1 y 2 (IGF-1 e IGF-2) y el receptor de estrógeno alfa (ESR1) a partir del día 60 de gestación, y se conservan hasta el posparto para estimular el desarrollo del mismo (Taylor y col., 2001).

Los factores de crecimiento tipo insulínicos son proteínas nutricionalmente sensibles capaces de modular el crecimiento fetal y placentario (Baker y col., 1993; Liu y col., 1993), ya que participan en la partición y transferencia de nutrientes entre la sangre materna y fetal (Liu y col., 1993). Estos factores se unen al receptor del factor de crecimiento tipo insulínico (IGF1R) y a ERS1 y ERS2 para activar la proliferación, diferenciación y metabolismo (Nayak y Giudice, 2003). La distribución de sus receptores y proteínas de unión es muy amplia, hallándose a nivel cerebral, ovárico (células de la granulosa y tecales), uterino, placentario, entre otros, interviniendo en procesos anabólicos y catalíticos, a través de mecanismos endócrinos, autócrinos y parácrinos desde etapas tan tempranas como la embriogénesis hasta la vida adulta, con gran influencia en la vida y performance reproductiva a nivel gonadal y endócrino (Nayak y Giudice, 2003; Mognet y Martin, 1997).

El IGF-1 influye sobre la longitud y el peso fetal e incrementa el peso de órganos fetales tales como, el bazo, el pulmón, el corazón, la glándula adrenal, la pituitaria, el hígado y los músculos esqueléticos; a nivel de la placenta repercute sobre el número de placentomas, el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos, así como la transferencia transplacentaria de glucosa y aminoácidos desde la madre al feto. Se ha reportado que el IGF-1 es crítico para el desarrollo reproductivo de la hembra, interviniendo a nivel ovárico en la regulación de la proliferación, diferenciación y esteroidogénesis de las células foliculares, siendo un inductor de mitosis en las células de la granulosa, incluso en ausencia de FSH (hormona folículo estimulante), y aumentando la receptividad celular a la FSH, en animales domésticos (Toori y col., 2014; Demeestere y col., 2004); siendo además muy importante en la fertilización, implantación y desarrollo embrionario (Toori y col., 2014; Rivas López y col., 2011). A nivel uterino, regula la proliferación y desarrollo de la mucosa y capas musculares a través de sus receptores desde etapas gestacionales tempranas hasta postnatales y se ha observado que intervienen en muchos tejidos regulando la respuesta a las hormonas esteroideas (Taylor y col., 2001).

El IGF-2 ejerce acciones que promueven el crecimiento en los tejidos fetales en forma indirecta a través de su influencia sobre la placenta (principalmente sobre su crecimiento y la capacidad de transportar nutrientes), al contrario de lo que ocurre con el IGF-1, el cual se ha demostrado que regula el crecimiento y desarrollo fetal en forma directa (Igwebuike, 2010).

Debido a esta acción directa y al rol crítico sobre el desarrollo del aparato reproductivo, es de esperar que los niveles circulantes de IGF-1 (pero no de IGF-2) tengan una fuerte relación con el grado de desarrollo histológico de ovarios y úteros durante la vida fetal.

Hipótesis

La restricción de la dieta materna durante el final de la gestación provoca balance energético negativo fetal, afectando los niveles de GLU e IGF-1 circulante y repercutiendo sobre el desarrollo histológico del útero y ovarios fetales después del nacimiento.

Objetivo general

Correlacionar el efecto de la desnutrición materna, durante la última etapa de la gestación, con los niveles plasmáticos maternos de GLU e IGF-1, y con el desarrollo histológico del útero y ovarios de las corderas hijas.

Objetivos específicos

Evaluar el efecto de la desnutrición materna durante la gestación tardía en los niveles circulantes de GLU en las últimas semanas de gestación y primer día posparto en ovejas y primeras 8 semanas de vida en las corderas hijas.

Evaluar el efecto de la desnutrición materna durante la gestación tardía en los niveles circulantes de IGF-1 en la semana previa al parto en ovejas y primeras 5 semanas de vida en las corderas hijas.

Determinar los niveles circulantes de estradiol en la semana preparto en ovejas y a los dos meses de vida en las corderas hijas.

Determinar y comparar el peso y desarrollo histológico del útero y ovarios a los dos meses de vida en las corderas hijas.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ovejas (N=8) Hampshire Down preñadas de alrededor de 90 días de gestación (determinado por ecografía con transductor sectorial de 5 MHz), las que fueron trasladadas a la Universidad Nacional de Río Cuarto y mantenidas en corrales individuales y contiguos con agua ad libitum en galpones de la Cátedra de Nutrición Animal de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC). Los animales estaban alojados de tal manera que podían observarse entre ellos, eliminando cualquier estrés causado por aislamiento.

Las ovejas fueron asignadas al azar a dos grupos: restringidas (R) y controles (C), cada uno con un N=4. Luego del período de acostumbramiento de una semana con dieta de mantenimiento para la edad gestacional, los animales en el grupo R se alimentaron con una dieta que cubría el 50% de los requerimientos de EM según el NRC (1985) para una oveja preñada, mientras que los animales en el grupo control se realizó una dieta que cubrió el 100% de sus requerimientos, hasta la finalización de la gestación (144-148 días). La alimentación se administró 1 vez por día al mediodía; su composición fue de heno de alfalfa y grano entero de maíz.

Luego del parto, los corderos se identificaron apropiadamente y se pesaron. Las ovejas de ambos grupos se alimentaron con dieta de lactancia, siendo el cambio hacia ésta gradual para no afectar el ambiente ruminal.

Toma de muestras

Se colectaron muestras sanguíneas de la vena yugular de las ovejas en ambos grupos, desde el día 0 (cuando las ovejas del grupo R se comienzan a alimentar con el 50% de los requerimientos) y una vez por semana hasta el parto, cuando se tomó la última muestra de sangre de las ovejas. Posteriormente, se tomaron muestras de sangre de las corderas en el día de nacimiento y luego una vez por semana hasta la eutanasia a los 60 días, donde el desarrollo histológico y estructural de las capas uterinas se ha completado (Carpenter y col., 2003; Wiley y col., 1987). La sangre se colectó en tubos de vidrio, luego fueron centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos para obtener el suero, el cuál se conservó a -20°C hasta su análisis.

Para la toma de muestras de tejidos las corderas se eutanasiaron alrededor de los 60 días de edad. Los úteros de cada cordera se disecaron separándolo del ligamento ancho, oviducto y cérvix. Luego fueron pesados. Los ovarios también se disecaron y pesaron. Uno de los ovarios y una sección de 1 cm³ de la porción media de cada cuerno se colocaron en formalina al 4% a temperatura ambiente para histología.

Medición de metabolitos sanguíneos

Los niveles de GLU se determinaron en el momento de la toma de muestras con el dispositivo ACCU-CHEK Performa.

La determinación de IGF1 y estradiol (E₂) fue realizado por radioinmuno-análisis (RIA) en el laboratorio IBYME (CONICET). Para el IGF-1 se hizo una extracción previa con HCl-etanol y crioprecipitación, mientras que el E₂ se extrajo con éter etílico (Lacau-Menjido y col., 2000).

En las madres estos metabolitos se midieron en la última muestra sanguínea colectada la semana previa al parto (semana -1), mientras que en las crías las mediciones de IGF-1 se hicieron a lo largo de los 50 días de muestreo sanguíneo y el E₂ se midió en la última muestra colectada previo al sacrificio.

Histología

Se realizaron cortes de los tejidos ováricos y uterino parafinados y se colorearon con hematoxilina y eosina siguiendo una metodología estándar. La observación microscópica se realizó con un microscopio de luz convencional con cámara fotográfica acoplada.

Para los preparados de ovario la medición del diámetro folicular se determinó a través del software Fiji (Schindelin y col., 2012), realizando la medición en todos los folículos que se podían observar enteros en la foto a 4X. Por cada animal, se determinó el diámetro folicular en al menos 4 cortes histológicos. Para los preparados de útero, se realizó el conteo de glándulas endometriales y células glandulares en fotos a 40X con el software Photoimpact. Las glándulas que se contaron eran las que se encontraban en la zona ventral del cuerno uterino, y se consideraban si estaba al menos la mitad de la glándula. El conteo de las células glandulares se realizó tomando 10 glándulas al azar (no se contaron células superpuestas, ni en mitosis).

Análisis estadístico

Los resultados de GLU materna y de las crías, y los niveles de IGF-1 de las crías fue analizado como medidas repetidas en el tiempo en un modelo mixto utilizando el procedimiento MIXED de SAS (SAS Version 9.2 for Windows, SAS Institute, Cary, NC, USA), considerando al animal como efecto aleatorio. El modelo incluyó el efecto del grupo materno y la edad y la interacción entre ambos términos. El resto de los resultados fueron analizados por ANOVA, utilizando el procedimiento GLIMMIX de SAS (SAS Version 9.2 for Windows, SAS Institute, Cary, NC, USA) con la oveja tratada como efecto aleatorio. Los datos son expresados como valor medio \pm la DE para cada edad. Los resultados fueron considerados significativos cuando el valor p fue menor a 0.05, mientras que un valor p entre 0,05 y 0,1 fue considerado una tendencia.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Concentraciones sanguíneas de glucosa en ovejas madres

Hubo a una tendencia a menores niveles de GLU en las ovejas del grupo R comparado con las ovejas del grupo C ($p=0,06$). Los niveles de GLU no variaron significativamente con la edad gestacional ($p=0,14$), y no hubo interacción significativa entre el grupo materno y la edad gestacional ($p=0,36$). Para cada edad gestacional, hacia la semana -2 las diferencias entre las concentraciones de GLU sanguínea fueron significativas ($p=0,01$) entre los grupos, mientras que hubo una tendencia a menores valores de GLU en el grupo R en la muestra postparto ($p=0,09$). En el gráfico se aprecia que la curva de GLU para el grupo "Control" fue más estable en el tiempo en comparación con el grupo "Restringido" en el que la curva muestra variaciones más pronunciadas.

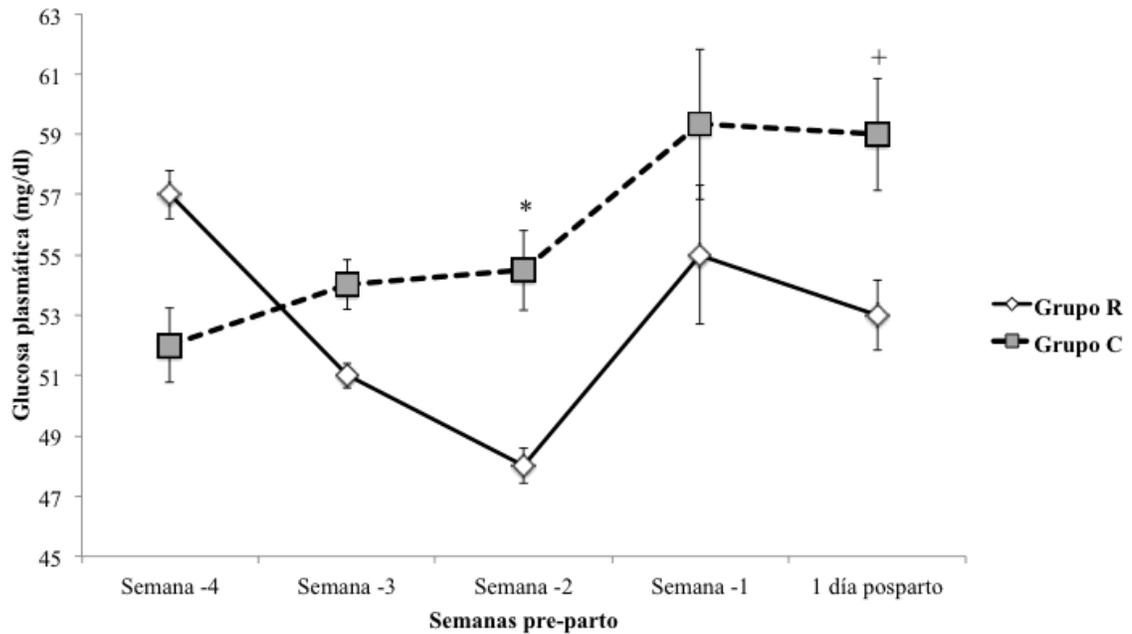


Figura 1: Niveles promedio de glucosa sanguínea en ovejas preñadas alimentadas al 100% (Controles o "C") o al 50% (Restringidas o "R") de los requerimientos durante el último mes de gestación (* $p=0,01$; + $p=0,09$).

Concentraciones sanguíneas de IGF-1 en ovejas madres

Los valores obtenidos de IGF-1 para las ovejas del grupo "C" fueron de $153,22 \pm 56,37$ ng/ml y para las del grupo "R" de $93,06 \pm 18,98$ ng/ml. No hubo diferencias significativas entre los grupos, pero sí una tendencia a menor valor para este último grupo ($p=0,08$).

Concentraciones sanguíneas de estradiol en ovejas madres

A pesar de la aparente diferencia expuesta en el gráfico no hubo diferencias significativas entre los grupos (Figura 2).

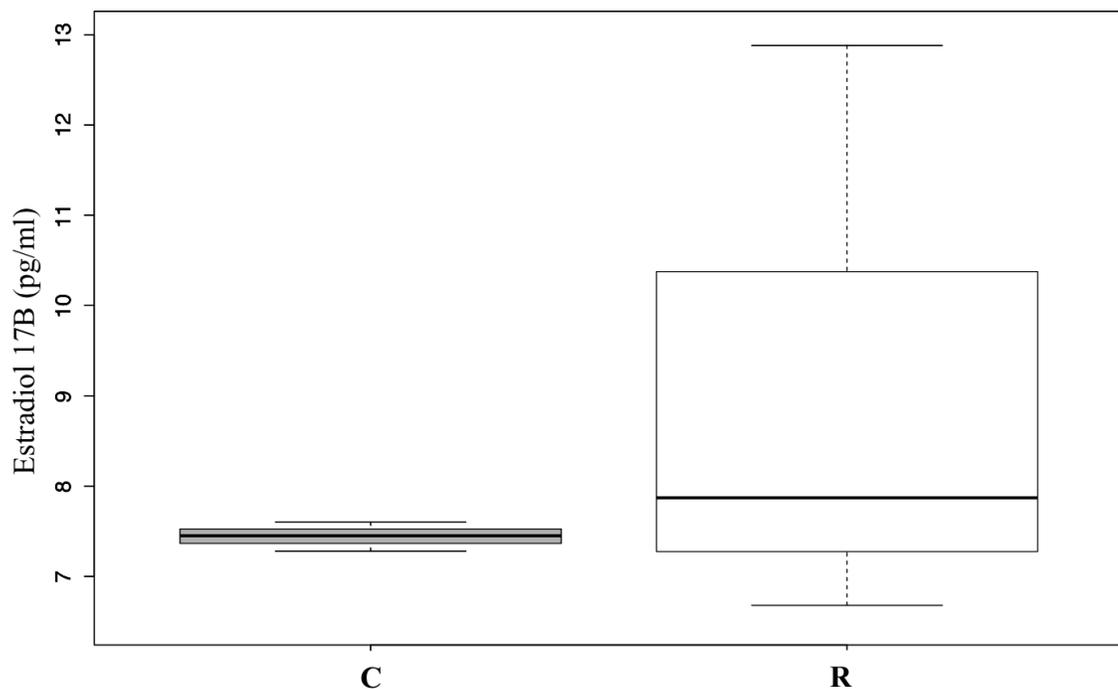


Figura 2: Concentraciones sanguíneas de estradiol durante la semana previa al parto de ovejas alimentadas al 100% (Controles o "C") o al 50% (Restringidas o "R") de los requerimientos durante el último tercio de la gestación. No hubo diferencias significativas entre los grupos.

Concentraciones sanguíneas de glucosa en corderas

No hubo diferencias significativas en los niveles de GLU entre las corderas nacidas del grupo "C" o "R" durante los primeros 2 meses de vida ($p=0,12$). Sin embargo, el efecto de la edad fue significativo ($p<0,0001$), y la interacción entre ambos términos también ($p=0,04$), por lo que el efecto del grupo materno sobre los niveles de GLU en las corderas dependió de la edad. Las corderas nacidas de las ovejas en el grupo "R" presentaron niveles significativamente menores de GLU las primeras 24 - 48 horas posparto en relación a los niveles en corderas nacidas de ovejas en el grupo "C" ($p=0,0002$) (Figura 3). A partir de la primera semana de vida los valores fueron similares entre los grupos, con mayores valores numéricos de glucemia a favor de las corderas nacidas del grupo "C". A partir del mes de vida y hasta la finalización del estudio, las concentraciones de GLU sanguínea fueron similares entre las corderas nacidas de las ovejas en ambos grupos de estudio.

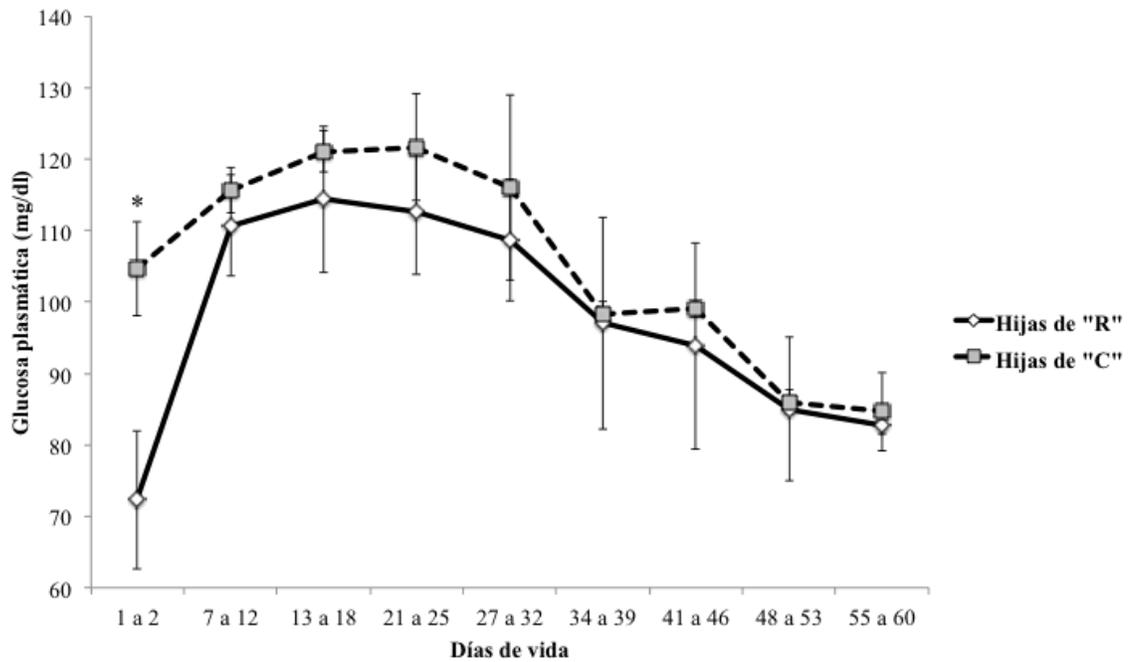


Figura 3: Niveles promedio de glucosa sanguínea en corderas nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el último tercio de gestación (Restringidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C") (* $p<0,05$).

Concentraciones sanguíneas de IGF-1 en corderas

El efecto del nivel nutricional materno tendió a afectar los niveles de IGF-1 en las corderas durante los primeros 40 días de vida ($p=0,058$). Los niveles de IGF-1 variaron significativamente debido a la edad ($p=0,0016$) y la interacción entre edad y grupo materno fue significativo ($p=0,005$). Como puede observarse en la figura 4, las medias de las concentraciones plasmáticas de IGF-1 en las corderas nacidas de las madres en ambos grupos difirieron significativamente a edades determinadas. Durante las primeras 48 horas, los valores de IGF-1 para las corderas nacidas de las madres en el grupo "R" fueron significativamente muy inferiores (menores al doble) comparado con las corderas nacidas de las madres en el grupo "C" ($p=0,0003$). La diferencia también fue significativa entre la primera y segunda semana de vida ($p=0,04$). Alrededor del día 25 posparto los valores no mostraron diferencias entre las corderas nacidas de las ovejas en ambos grupos.

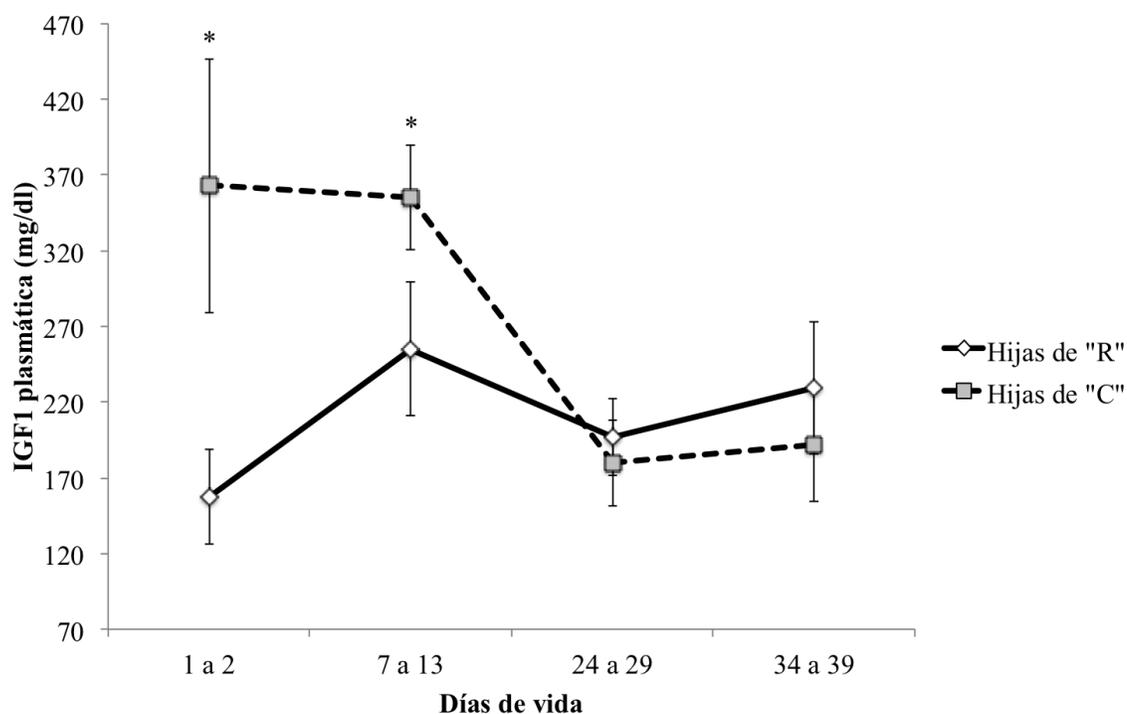


Figura 4: Niveles promedio de IGF-1 sanguíneos en corderas nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el último tercio de gestación (Restringidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C") (* $p<0,05$).

Concentraciones sanguíneas de estradiol en corderas

En el siguiente gráfico de cajas (Figura 5) puede apreciarse una clara diferencia entre los grupos, estando fuertemente disminuida la producción de E2 en el grupo de corderas nacidas de las ovejas en el grupo "R" con diferencias significativas ($p=0,04$).

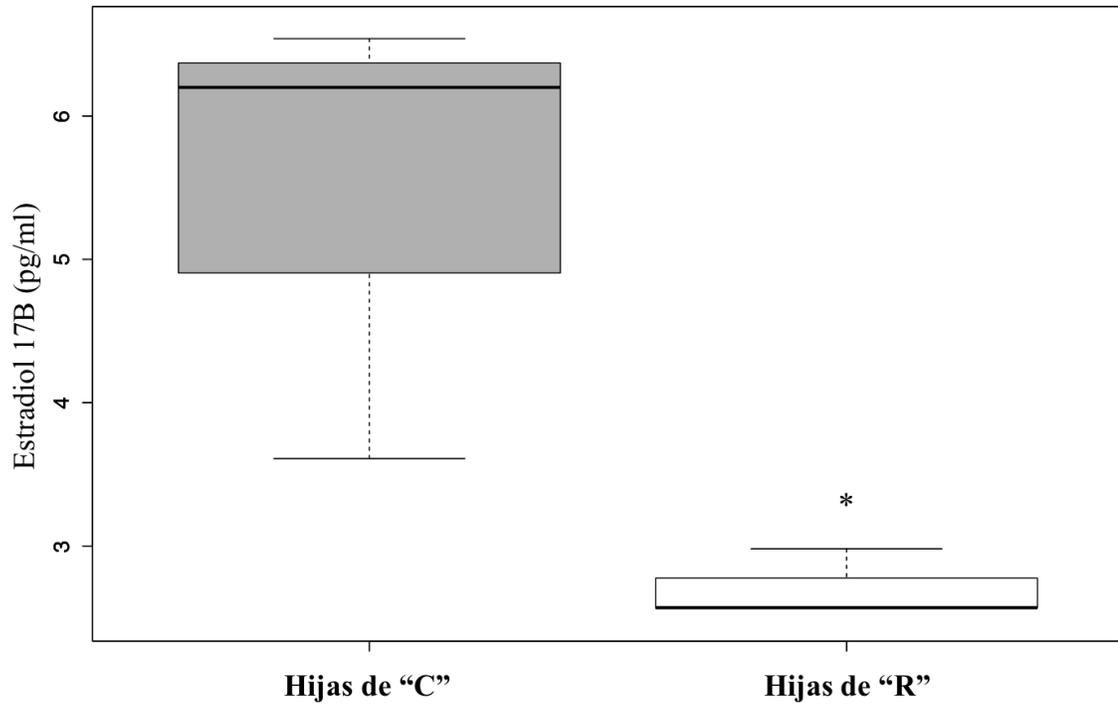


Figura 5: Concentraciones sanguíneas de estradiol obtenidas a los 50 días de vida de corderas nacidas de madres alimentadas al 100% (Controles o "C") o al 50% (Restringidas o "R") durante el último tercio de gestación. (* $p=0,04$).

Peso de los órganos reproductivos a los 60 días de vida

No hubo diferencias en el peso de los ovarios entre las corderas nacidas de las ovejas en ambos grupos, posiblemente porque el desarrollo de las gónadas se da en la gestación temprana, estando fuera del período de restricción nutricional de este estudio.

En cuanto al útero, hubo una severa disminución del peso del órgano de las corderas nacidas de las ovejas en grupo "R", comparado con el peso de los úteros de las corderas nacidas de las ovejas en el grupo "C" ($p < 0,05$) (Tabla 1).

Tabla 1. Peso promedio (gramos) de los órganos reproductivos en corderas nacidas de madres restringidas nutricionalmente al final de la gestación o controles. Letras diferentes indican diferencia significativa para cada órgano ($p < 0,05$).

Condición materna	Ovarios		Útero	
	Peso promedio	Desviación estándar	Peso promedio	Desviación estándar
Controles	0,53	0,25	4,86 ^A	1,52
Restringidas	0,60	0,36	2,83 ^B	1,61



Ilustración 1: Fotografía de útero de corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica (Restringidas o "R") durante el último tercio de la gestación o nacidas de madres alimentadas al 100% (Controles o "C").

Histología ovárica

El diámetro de los folículos secundarios y terciarios que se encontraron en los cortes histológicos de ovarios fue significativamente menor para las corderas nacidas de las madres en el grupo R (Figura 6, $p=0,006$) hacia los 60 días de vida, como puede observarse en las fotos de los cortes histológicos (Ilustración 2).

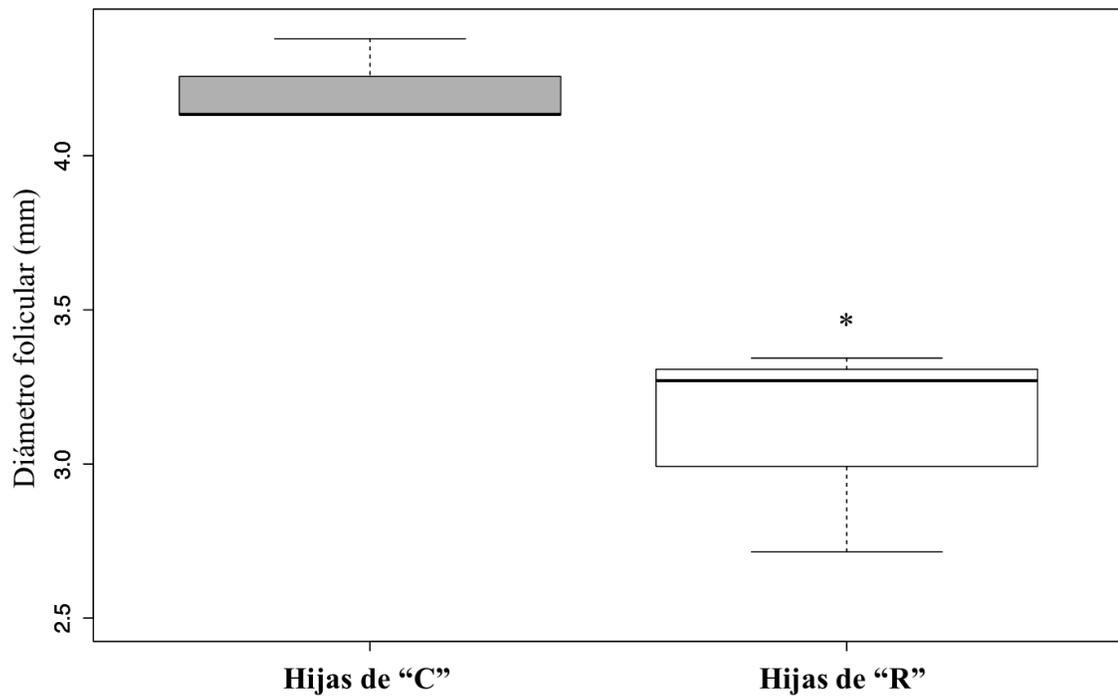


Figura 6: Diámetros promedio de folículos (secundarios y terciarios) ováricos en corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el último tercio de gestación (Restringsidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C") (* $p=0,006$).

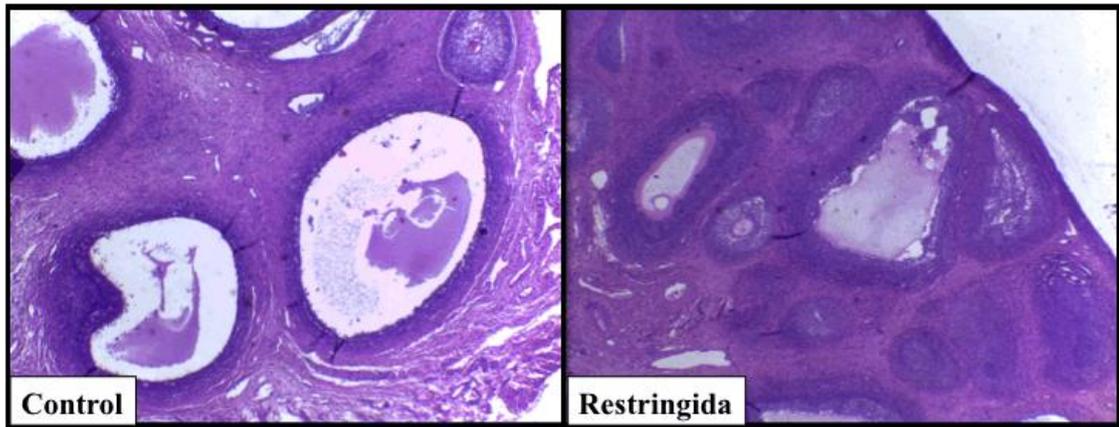


Ilustración 2: Imágenes de cortes histológicos de ovario captadas por el Software Fiji a un aumento de 4X de corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el último tercio de gestación (Restringidas) o alimentadas al 100% (Controles).

Histología uterina

El número de glándulas endometriales en los cortes histológicos de útero también fue significativamente menor para las corderas nacidas de las madres en el grupo “R” comparado con las corderas nacidas de las madres en el grupo “C” ($p=0,02$; Figura 7). No hubo diferencias en el número de células por glándula endometrial (22.3 y 26 células para las corderas nacidas de las ovejas en los grupos "C" y "R", respectivamente).

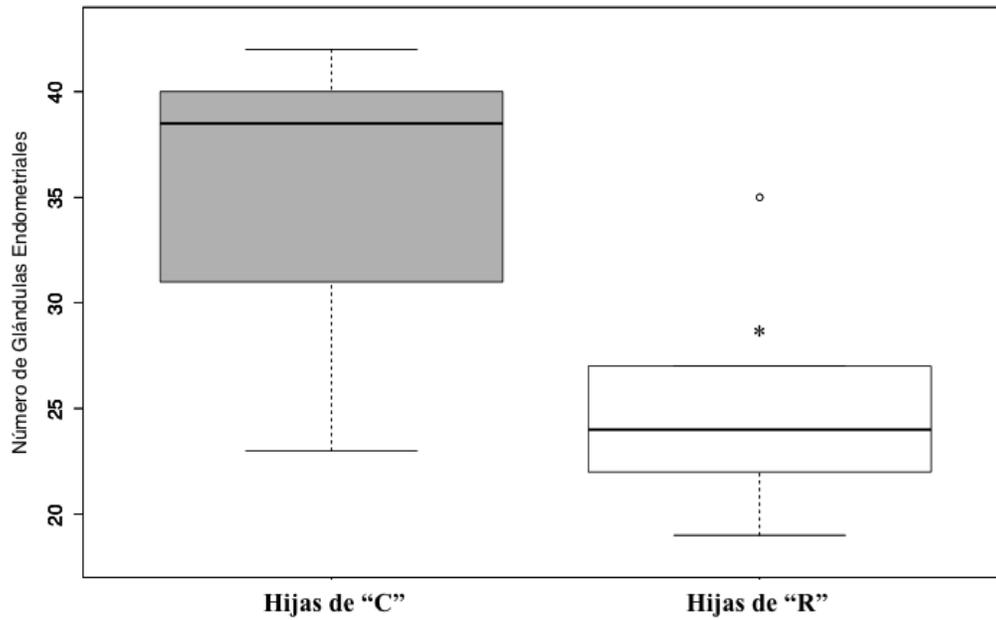


Figura 7.: Número promedio de glándulas endometriales en corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el último tercio de gestación (Restringidas o "R") o alimentadas al 100% (Controles o "C") (*p=0,02).

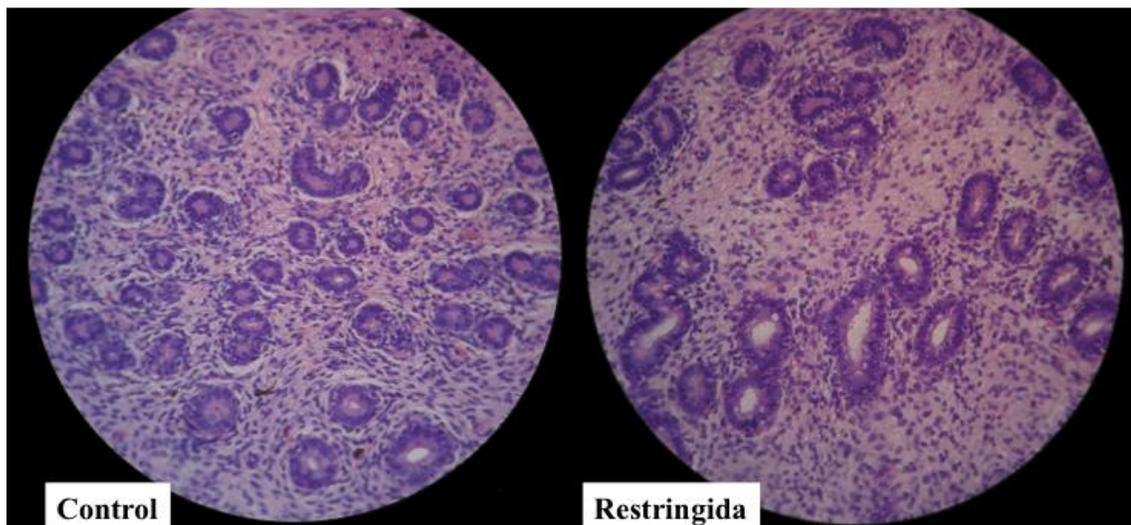


Ilustración 3: Imágenes de cortes histológicos de úteros captadas por el Software PhotoImpact a un aumento de 40X de corderas sacrificadas alrededor de los 60 días de vida nacidas de madres alimentadas al 50% de energía metabólica durante el último tercio de gestación (Restringidas) o alimentadas al 100% (Controles).

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

La restricción nutricional en ovejas gestantes puede tener muchos y diversos impactos tanto en etapas previas a la concepción como en etapas embriológicas y fetales. En gestaciones avanzadas, los efectos de la desnutrición se ven exacerbados debido al crecimiento del 75% de masa fetal y la gran demanda de nutrientes durante el último tercio de la preñez, ocasionando no solo perturbaciones en el desarrollo fetal sino también en la aparición de un importante número de enfermedades que se manifestarán en la vida adulta, como la resistencia a la insulina y síndrome metabólico (Gao y col., 2015).

En nuestro estudio, con respecto a la GLU, las madres mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos hacia la segunda semana pre parto (Figura 1). Para el caso de las crías, los menores niveles de GLU ($p < 0,05$) en las corderas nacidas de las ovejas del grupo "R" se manifestaron únicamente los primeros días posparto (Figura 3). Esto sugeriría por un lado, que el BEN de las madres del grupo "R" pudo ser más profundo y/o prolongado de lo reportado, debido a que en rumiantes puede ser más complicado observar grandes diferencias en las concentraciones de GLU sanguínea, las cuales tienden a ser muy estables en condiciones normales, y por otro lado, que el BEN materno repercutió en los niveles de GLU disponibles ocasionando un BEN fetal durante el último tercio de gestación o en algún momento de ella, con posible impacto en el desarrollo y crecimiento de órganos reproductivos fetales.

Los resultados reportados por Gao y col. (2015) y Lekatz y col. (2011) señalan que las concentraciones de GLU sanguínea se ven afectadas en ovejas con gestaciones avanzadas al igual que sus crías al nacimiento. En relación a lo anteriormente mencionado, Oliver y col. (1993) reportaron, mediante cateterización de fetos, una caída de los niveles de GLU e insulina fetales y maternos, después de 48 horas de restricción total de alimento en ovejas con preñeces avanzadas. Para períodos de desnutrición más amplios (desde la mitad de la gestación) se mantuvo el patrón de caída en forma paralela de la GLU e insulina en madres y fetos hacia las últimas semanas de gestación (Quigley y col., 2008; Osgerby y col., 2002). Además, se ha observado que la desnutrición de ovejas durante gestaciones avanzadas tiene un fuerte impacto en la homeostasis de la GLU en las crías posnacimiento con resistencia a la insulina en tejidos que se desarrollan durante este período de tiempo intrauterino, como el caso de los músculos

esqueléticos y tejido adiposo (Gardner y col., 2005). Parecería que en nuestro experimento y una vez superado los primeros días de vida, los niveles de GLU en las crías (de ambos grupos) no están alterados y en cuanto las corderas desarrollan sus hábitos alimenticios, las curvas de GLU se comportan de igual forma, al menos durante los 60 días posparto (Figura 3).

Si bien el mecanismo por el cual la restricción nutricional afecta el desarrollo fetal no es del todo conocido (Gao y col., 2015), el más aceptado es el siguiente: las ovejas en período gestacional y bajo condiciones de restricciones nutricionales entran en un período de BEN y producto de las menores concentraciones sanguíneas de GLU materna, el feto también desarrolla BEN. A modo de minimizar sus efectos, se desencadenan en la madre una serie de mecanismos adaptativos, comandados por el sistema endócrino, que modifican el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos (Gao y col., 2015). Se exagera la gluconeogénesis en el hígado (fuentes alternas para la obtención del GLU y cuyo sustrato energético es la GLU) y rápidamente se incrementa la lipólisis apareciendo en circulación concentraciones cada vez mayores de ácidos grasos no esterificados (AGNEs) y β -hidroxibutirato (BHB), los cuales son indicadores de movilización lipídica (con pérdida de peso corporal), mayor BEN, cetosis e hígado graso (Zhang y Tan, 2007). A medida que la restricción nutricional progresa, podrían desencadenarse fallas en el metabolismo hepático que pondrían en riesgo incluso hasta la vida del animal. El feto durante los últimos 2 meses de gestación alcanza entre el 80-85% de su peso final (Robinson y col., 1999; Symonds y col., 2001), por lo que podrían desencadenarse alteraciones permanentes en órganos o sistemas de órganos que alteren su metabolismo posnacimiento y que puedan expresarse durante la vida adulta del individuo (Gao y col., 2015; Mücke y col., 2010; Osgerby y col., 2002; Symonds y col., 2001).

Relacionado con la GLU, se encuentran los factores de crecimiento tipo insulínicos que son proteínas dependientes de las concentraciones de nutrientes, en especial de GLU y forman parte del eje de crecimiento, junto con la hormona de crecimiento (Hoffman y col., 2014) cumpliendo funciones muy importantes en el crecimiento y desarrollo embrionario, fetal y postnatal (Igwebuike, 2010). Los IGFs y sus receptores intervienen en la regulación del desarrollo, diferenciación y función endometrial, lo cual resulta fundamental en los ovinos ya que hasta el día 56 posparto hay un importante desarrollo del útero en las crías (Carpenter y col., 2003). Las ovejas preñadas bajo balance energético negativo (BEN) han sido relacionadas con

cuadros de hipoglucemia e hipoinsulinemia y consecuentemente menores niveles sanguíneos de IGF-1 (Scaramuzzi y col., 2006; Oliver y col., 1993).

En nuestro estudio los niveles maternos de IGF-1 no mostraron diferencia significativa entre los grupos. Distinto fue el caso para sus hijas, cuyos niveles estuvieron muy deprimidos las primeras 2 semanas de vida (Figura 4), con diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del grupo control. Similar a nuestros resultados, Hoffman y col., (2014) observaron que corderos nacidos de madres bajo restricción nutricional desde el día 116 al parto, presentaron niveles circulantes significativamente menores de IGF-1 pero sin diferencias significativas entre las concentraciones de GLU. En otros estudios, Osgerby y col., (2002) y Oliver y col., (1993) restringieron ovejas con gestaciones avanzadas y mediante cateterización de los fetos relacionaron el BEN inducido en las madres con el consecuente BEN, hipoglucemia y menores niveles de IGF1 fetales.

En base a los experimentos citados anteriormente y a nuestros resultados, es posible inferir que a partir del BEN materno y niveles alterados de IGF-1 en el grupo "R", se desarrolle un BEN fetal que deprima los niveles de IGF-1 durante la vida intrauterina, justificando al posparto la disminución de los valores sanguíneos de GLU e IGF-1 entre los días 1 y 2 de nacimiento (Figura 3) y las primeras semanas (Figura 4), respectivamente.

Como se mencionó anteriormente, una de las principales funciones de los IGF son la de estimular la proliferación y diferenciación celular en diversos órganos, incluyendo los ovarios y útero (Nayak y Giudice, 2003). En nuestro estudio, los órganos reproductivos de las corderas nacidas de las hembras en el grupo "R" tuvieron afectados su arquitectura histológica y su grado de desarrollo.

Con respecto a los ovarios, no hubo diferencia significativa entre los grupos en cuanto al peso de los mismos (Tabla 1), lo que podría deberse a que el desarrollo ovárico en pequeños rumiantes tiene lugar entre los 55-60 días de gestación (Eckery y col., 1996). A pesar de esto hay evidencia en la que se ha reportado disminución de masa total ovárica en hijas de ovejas restringidas nutricionalmente en algún momento de la primera mitad de la gestación (Rae y col., 2001, 2002c; Osgerby y col., 2002) y otra en la que no se ha visto efecto alguno sobre la masa ovárica (Kotsampasi, 2009). Sin embargo, estos estudios coincidieron en que el patrón de crecimiento folicular fue alterado por el régimen alimenticio comparado con el grupo de referencia.

A nivel histológico, en este estudio observamos que los diámetros foliculares de las corderas nacidas de ovejas en el grupo "R" fueron significativamente menores ($p=0,006$) respecto a las nacidas del grupo "C" (Figura 6, Ilustración 2). Si bien el máximo desarrollo de los ovarios tiene lugar hacia los 55-60 días de vida intrauterina, durante los primeros dos meses de vida hay crecimiento continuo de folículos que lleva a incrementos de la masa ovárica en las corderas recién nacidas (Carpenter y col., 2003). Además en ratas se observó que ante la ausencia total de IGF-1 los folículos rara vez superaban los estadios primarios y secundarios (Baker y col., 1996). Los menores niveles sanguíneos de IGF-1 reportados en las corderas hijas de ovejas en el grupo "R" (Figura 4) explicaría lo evidenciado con la histopatología: debido a que el IGF-1 es un fuerte precursor de la mitosis en las células de la granulosa, aumentando el número de receptores para hormonas gonadotróficas, en especial FSH (hormona folículo estimulante), este factor regula el crecimiento folicular y la producción de hormonas esteroideas (Toori y col., 2014; Rivas López y col., 2011). En concordancia, los niveles sanguíneos de E_2 a los dos meses de edad estuvieron fuertemente deprimidos en las corderas nacidas de las ovejas en el grupo "R" (Figura 5), sustentando el concepto de disfunción ovárica en estas corderas.

Con respecto al desarrollo uterino, observamos diferencias significativas ($p=0,02$) entre las corderas nacidas de ambos grupos respecto al número de glándulas endometriales (Figura 7, Ilustración 3). Los menores niveles de IGF-1, la disfunción ovárica y menores concentraciones séricas de E_2 (Figura 5) explicarían el menor desarrollo glandular uterino y respaldarían los menores pesos registrados para los úteros en las corderas nacidas de ovejas en el grupo "R" (Tabla 1). Con similares resultados, Baker y col. (1996) reportaron que los úteros de ratas no superaban el 15% del tamaño adulto y el componente glandular estuvo fuertemente afectado ante la ausencia total de IGF-1.

Es de suma importancia recordar que las crías nacen con úteros inmaduros y que el principal desarrollo histológico de los mismos tiene lugar desde la primer semana de vida, con la formación de las glándulas uterinas, hasta los 56 días posparto donde se completaría la morfogénesis uterina, con claras separaciones entre las zonas intercarunculares o glandulares y las zonas carunculares o aglandulares, característicos en los úteros adultos (Carpenter y col., 2003; Wiley y col., 1987).

CAPÍTULO V

CONCLUSIÓN

Las restricciones nutricionales en el último tercio de gestación producen alteraciones en los niveles sanguíneos de GLU y de IGF-1 en ovejas que pueden afectar el desarrollo de órganos reproductivos de sus crías.

Los niveles de GLU e IGF-1 en las corderas se vieron fuertemente afectados durante los primeros días (GLU) y primeras semanas (IGF-1) posteriores al parto, lo que alteraría la foliculogénesis ovárica y el desarrollo de las glándulas uterinas durante los primeros 2 meses de vida. En consecuencia, las corderas nacidas de las ovejas en el grupo “R” muestran un útero más inmaduro que las corderas nacidas de las ovejas en el grupo “C”, a una edad en la que el útero ya tiene que estar histológicamente desarrollado.

Esto haría de suponer que la fertilidad de las crías durante la vida adulta estaría comprometida, con menores tasas de preñez y aumento en los porcentajes de pérdidas embrionarias/fetales, aunque se aconsejan mayores experiencias con evaluaciones más prolongadas en el tiempo de los grupos de estudio para realizar conclusiones definitivas.

Bibliografía

BAKER, J., LIU J-P, EJ. ROBERTSON, A. EFSTRATIADIS.1993. **Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth.** Cell ; 75(1):73–82.

BAKER, J., MP. HARDY, J. ZHOU, C. BONDY, F. LUPU, AR. BELLVE et al.1996. **Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction.** Mol Endocrinol;10(7):903–18.

BARKER, DJP. 2007. **Introduction: the window of opportunity.** The Journal of Nutrition;137(4):1058–9.

DE BOO, HA., JE. HARDING.2006. **The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis.** Aust N Z J Obstet Gynaecol; 46(1):4–14.

DEMEESTERE, I., C. GERVY, J. CENTNER, F. DEVREKER, Y. ENGLERT, A. DELBAERE. 2004. **Effect of Insulin-Like Growth Factor-I During Preantral Follicular Culture on Steroidogenesis, In Vitro Oocyte Maturation, and Embryo Development in Mice.** Biol Reprod;70:1664–1669.

EDWARDS, LJ., IC. McMILLEN.2001. **Maternal undernutrition increases arterial blood pressure in the sheep fetus during late gestation.** J Physiol;533 (Pt 2):561–70.

HERNANDEZ-MEDRANO J.H., BK. CAMPBELL, R. WEBB. 2012. **Nutritional Influences on Folliculogenesis.** Reprod Dom Anim; 47(4):274-282.

HOAGLUND, CM. , VM. THOMAS, MK. PETERSEN, RW KOTT. 1992. **Effects of supplemental protein source and metabolizable energy intake on nutritional status in pregnant ewes.** Journal of animal science; 70(1):273–80.

IGWEBUIKE, UM. 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.

JONES, JI. y DR. CLEMMONS.1995. **Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions.** Endocrine reviews.

LEA, RG., LP. ANDRADE, MT. RAE, LT. HANNAH , CE. KYLE, JF. MURRAY, SM. RHIND, DW. MILLER. 2006. **Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on apoptosis regulators in the ovine fetal ovary.** *Reproduction* 131, 113-124.

LINDSAY, D., M. GRAEMEB y W. IH. 1993. **Nutrition and reproduction.** *Reproduction Domestic Animal*; 459-91.

LIU J.P., J. BAKER, A.S PERKINS, E.J ROBERTSON, A. EFSTRATIADIS. 1993. **Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type-1 IGF receptor (Igf1r).** *Cell* 75, 59-72.

LUTHER, JS., DA. REDMER, LP. REYNOLDS, JM. WALLACE.2005. **Nutritional paradigms of ovine fetal growth restriction: implications for human pregnancy.** *Hum Fertil (Camb)*;8(3):179-87.

MONGET, P. y GB. MARTIN.1997. **Involvement of insulin-like growth factors in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals.** *Hum Reprod*;12 Suppl 1:33-52.

NAYAK, NR. y LC. GIUDICE. 2003. **Comparative biology of the IGF system in endometrium, decidua, and placenta, and clinical implications for foetal growth and implantation disorders.** *Placenta*. 24, 281.

OLIVER, MH., JE. HARDING, BH. BREIER, PC. EVANS, PD. GLUCKMAN.1993. **Glucose but not a mixed amino acid infusion regulates plasma insulin-like growth factor-I concentrations in fetal sheep.** *Pediatric research*; 34: 62-62.

RAE, MT., CE. KYLE, DW. MILLER, AJ. HAMMOND, AN. BROOKS, SM. RHIND. 2002. **The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep.** *Animal Reproduction Science* 72: 63-71.

REYNOLDS, LP., PP. BOROWICZ, JS. CATON, KA. VONNAHME, JS. LUTHER, CJ. HAMMER et al.2010. **Developmental programming: the concept, large animal models, and the key role of uteroplacental vascular development.** *J Anim Sci*;88(13 Suppl):E61-72.

RIVAS LÓPEZ, PC., A. SUAREZ LONDONO, E. RAMÍREZ CARDONA. 2011. **Influencia de las hormonas metabólicas y la nutrición en el desarrollo folicular en el ganado bovino: implicaciones prácticas.** *Rev. Med. Vet.*,21:155-173.

SCARAMUZZI, RJ., BK. CAMPBELL, JA. DOWNING, NR. KENDALL, M. KHALID, MUNOZ-GUTIERREZ et al.2006. **A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate.** *Reprod Nutr Dev* ;46(4):339–54.

SPENCER, TE., KA. DUNLAP, J. FILANT.2012.**Comparative developmental biology of the uterus: insights into mechanisms and developmental disruption.** *Mol Cell Endocrinol*; 354(1-2):34–53.

TAYLOR, KM., C. CHEN, CA. GRAY , FW. BAZER, TE. SPENCER. 2001. **Expression of messenger ribonucleic acids for fibroblast growth factors 7 and 10, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factors and their receptors in the neonatal ovine uterus.** *Biol Reprod*;64(4):1236–46.

TOORI, MA., E. MOSAVI, M. NIKSERESHT, MJ. BARMAK, R. MAHMOUDI. 2014. **Influence of Insulin-Like Growth Factor-I on Maturation and Fertilization Rate of Immature Oocyte and Embryo Development in NMRI Mouse with TCM199 and α -MEM Medium.** *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, Vol.8(12):AC05-AC08.

TYGESEN, MP., MO. NIELSEN, P. NORGAARD, H. RANVIG, AP. HARRISON, AH. TAUSON. 2008. **Late gestational nutrient restriction: effects on ewes' metabolic and homeorhetic adaptation, consequences for lamb birth weight and lactation performance.** *Arch Anim Nutr*;62(1):44–59.

VILA MORET, C. 2012. **Demanda impulso la producción ovina.**

WU, G., FW. BAZER, JM. WALLACE, TE. SPENCER.2006. **Board-invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences.** 84(9):2316–37.

YING, S J., SH. XIAO, CL. WANG, BS. ZHONG, GM. ZHANG, ZY. WANG, DY. HE, XL. DING, HJ. XING, WANG F. 2013. **Effect of nutrition on plasma lipid profile and mRNA levels of ovarian genes involved in steroid hormone synthesis in Hu sheep during luteal phase.** *J. Anim. Sci.*91:5229–5239.

YUEN, BS., PC. OWENS, JR. MCFARLANE, ME. SYMONDS, LJ. EDWARDS, KG.
KAUTER et al. 2002. **Circulating leptin concentrations are positively related to leptin messenger RNA expression in the adipose tissue of fetal sheep in the pregnant ewe fed at or below maintenance energy requirements during late gestation.** Biol Reprod;67(3):911–6.