

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EFFECTO DEL PLANO NUTRICIONAL SOBRE EL DESARROLLO TESTICULAR
FETAL EN OVINOS A CAMPO NATURAL**

por

Sebastián Elías MONTALDO BERRIEL

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
**Orientación: Higiene, Inspección, Control y
Tecnología de los Alimentos de Origen Animal**

MODALIDAD TRABAJO EXPERIMENTAL

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2018**

PÁGINA DE APROBACIÓN

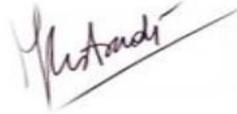


Presidente de Mesa: _____

Dr. Jorge Gil

Segundo Miembro (Tutor): _____

Dr. Alejandro Bielli



Tercer Miembro: _____

Dra. María José Estrada



Cuarto Miembro (Co-tutor): _____

Dra. Raquel Pérez Clariget

Quinto Miembro (Co-tutor): _____

Dra. Patricia Genovese

Fecha de aprobación:

23 de Octubre de 2018

Autor: Sebastián MONTALDO BERRIEL

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a mis padres, que con sus ejemplos de perseverancia, esfuerzo y dedicación han constituido mis propias concepciones en lo que concierne a la realización personal.

Manifiesto por este medio, que representan para mí un pilar fundamental y que los tengo muy presentes en cada una de mis decisiones, entendiendo que además de familia, mis padres son mis mayores amigos en esta vida.

Trasmitirle a mi tutor Dr. Alejandro Bielli lo valioso de encontrarlo en este viaje, con quien abordé el mundo de la investigación. Agradecerle por compartir conmigo sus ideas durante este arduo período transmitiéndome su disponibilidad y entrega en su tarea profesional.

A mi co-tutora Dra. Patricia Genovese por incursionarme en la tarea práctica dentro del laboratorio. Agradecerle porque con sus conocimientos he construido también los míos. Convencido de que la investigación nos reunirá en posteriores oportunidades.

Dejar expresado mi agradecimiento a mi co-tutora Raquel Pérez, quien ha demostrado tener gran disponibilidad en este ámbito sugiriendo aportes de gran valor para este trabajo.

También agradecer a Micaela Acosta, quien en más de una ocasión me ayudó con la redacción de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDO	4
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	8
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	10
Programación fetal.....	10
Realidad productiva uruguaya para los ovinos y subnutrición.....	10
Desarrollo reproductivo e histología testicular.....	12
Programación fetal por subnutrición.....	15
Consecuencias intrauterinas y extrauterinas al restringir el plano nutricional....	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Localización, animales, diseño experimental y tratamientos.....	19
Registros, muestreos y análisis.....	20
Análisis estadísticos.....	21
RESULTADOS	22
Peso y condición corporal de las madres.....	22
Variables registradas en los fetos.....	23
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

- **Cuadro 1.** Disponibilidad y altura del campo natural, y requerimientos energéticos y proteicos cubiertos con la oferta de forraje de los tratamientos aplicados.....20
- **Cuadro 2.** Efecto del tratamiento sobre las variables estudiadas.....23
- **Cuadro 3.** Correlaciones significativas entre las variables estudiadas.....24

- **Figura 1.** Producción mensual promedio de forraje (kg de materia seca por hectárea) del campo natural y ciclo reproductivo de la oveja. Fuente: Carambula, 1987.Tomado de Abud, 2015.....11
- **Figura 2.** Crecimiento fetal desde el día 60 hasta el parto en ovejas Targhee con fetos únicos o mellizos. Adaptado de Koong y col., 1975.....12
- **Figura 3.** Esquema del testículo ovino y órganos vecinos.....14
- **Figura 4.** Evolución del peso y la condición corporal en las madres de los fetos muestreados.....22

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de diferentes ofertas de forraje de campo natural desde 3 semanas previas y durante la gestación, sobre el crecimiento y el desarrollo testicular en términos de peso corporal y testicular, con técnicas histológicas cuantitativas: diámetro y volumen porcentual de cordones testiculares y número de células de Sertoli, en fetos ovinos. A partir de 355 ovejas Corriedale que pastorearon dos ofertas (AOF 10 kg de materia seca (MS)/ 100 kg de peso/día y BOF oferta 5 kg MS/100 kg de peso/día y baja) de campo natural desde tres semanas antes de la concepción en la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt, Cerro Largo, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, se procesaron, en el laboratorio de Histología y Embriología de la Facultad de Veterinaria (Sede Central, Montevideo), los testículos de 18 (AOF n= 9; BOF: n=9) fetos de 70 días de gestación. Las ovejas de AOF fueron más pesadas (AOF: $47,2 \pm 0,41$ kg vs. BOF: $44,7 \pm 0,41$ kg; $P < 0,0024$) y tuvieron mayor CC (AOF: $2,69 \pm 0,01$ vs. BOF: $2,50 \pm 0,01$; $P < 0,0001$) que las de BOF. Ambas variables fueron afectadas por los días de gestación ($P < 0,0001$) y la interacción entre tratamiento y días de gestación ($P < 0,0098$). Al momento del sacrificio (70 días de gestación), las ovejas de AOF estaban manteniendo peso y CC ($p > 0,1$) mientras que las de BOF estaban en balance energético negativo que se reflejó en pérdida de peso y CC ($P < 0,05$). El diámetro de los cordones testiculares tendió ($p = 0,08$) a ser afectado por el tratamiento por lo que se realizaron análisis de covariables. No se encontró efecto del tratamiento cuando el peso del testículo izquierdo fue utilizado como covariable ($p = 0,13$), pero la tendencia ($p = 0,06$) persistió cuando el peso fetal fue utilizado como covariable. El número de gonocitos por corte también tendió ($p = 0,07$) a ser afectado por el tratamiento y esta tendencia ($p = 0,1$) persistió cuando el peso testicular izquierdo fue incluido en el modelo como covariable. El peso de la carcasa del feto presentó una alta y positiva correlación con el peso fetal. Por otra parte, el peso testicular izquierdo se correlacionó negativamente con el volumen porcentual del intersticio y presentó una alta correlación positiva con el volumen absoluto y la longitud de los cordones testiculares y con el número total de células de Sertoli. El diámetro de los cordones presentó una correlación positiva con el número de células de Sertoli y de gonocitos por corte transversal de cordón testicular. El número de células de Sertoli por corte de cordón testicular se correlacionó positivamente con el número de gonocitos por corte. Además, el número de células de Sertoli por corte de cordón testicular tendió a correlacionarse positivamente con el peso testicular izquierdo, con el volumen absoluto de cordones testiculares y con el número total de células de Sertoli. Se concluyó que la subnutrición de la oveja gestante a partir de 3 semanas antes de la encarnerada y durante los primeros 70 días de gestación tiene efectos relativamente moderados sobre el desarrollo del testículo en el feto temprano.

La conclusión de la presente tesis nos permitiría adoptar decisiones mejor informadas en el manejo alimentario de corderos y carneros, mejorando la eficiencia de los sistemas productivos ovinos.

SUMMARY

The aim of this thesis was to evaluate the effect of different offers of natural pasture week before and during gestation, on testicular growth and development in terms of body and testicular weight, as well as quantitative histological techniques: diameter and percentual volume of testicular cords and number of Sertoli cells in ovine fetuses. From 355 Corriedale ewes that grazed 2 offers (high: AOF and low: BOF) of natural pasture in Bernardo Rosengurtt Experimental Station, Cerro Largo, Faculty of Agronomy, the testicles of 18 (AOF n= 9, BOF n=9) 70 days fetuses were processed in the Histology and Embryology laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine (Headquarters, Montevideo). Ewes from AOF were heavier ($47,2 \pm 0,41$ kg vs. $44,7 \pm 0,41$ kg; $P=0,0024$) and their body condition score was greater ($47,2 \pm 0,41$ kg vs. $44,7 \pm 0,41$ kg; $P=0,0024$). Both variables were affected by gestation day ($P < 0,0001$) and by the interaction between treatment and gestation day. At slaughter (gestation day 70) AOF ewes weight and BCS were stable ($p > 0,1$) but BOF ewes were losing both weight and BCS ($P < 0,05$). The diameter of the testicular cords tended ($p = 0,08$) to be affected by the treatment. No effect was found when the left testis was used as covariable ($p=0,13$) but the tendency ($p=0,06$) persisted when the fetal weight was used as covariable. The number of gonocytes per section also tended ($p = 0,07$) to be affected by treatment and such tendency persisted ($p = 0,1$) when the left testicular weight was included in the model as covariable. Carcass weight correlated highly and positively with fetal weight. Left testis weight correlated negatively with interstitial percentual volume and correlated positively with absolute volume and length of testis cords and with total number of Sertoli cells. The diameter of the testis cords correlated positively with total number of Sertoli cells and of gonocytes. The number of Sertoli cells per section correlated positively with the number of gonocytes per section. The number of Sertoli cells per section correlated positively with testis weight, absolute volume of testis cords and with total number of Sertoli cells. We concluded that the undernourishment of the pregnant sheep from 3 weeks before the joining and during the first 70 days of gestation determines relatively moderate effects on the development of the testicle in the early fetus. The strong effects observed when undernutrition occurs throughout pregnancy are attributable to the second half of pregnancy; the conclusion of the present thesis would allow taking better informed decisions in the feeding management of lambs and rams, hopefully improving the efficiency of ovine production systems.

INTRODUCCIÓN

Hemos elegido el modelo ovino porque se trata de una especie relevante en producción animal, y que además se ha utilizado como modelo biológico para otras especies productivas de ciclos biológicos más largos, así como para la especie humana.

La producción ovina se desarrolla generalmente sobre campo natural en la zona basáltica y cristalina del país, sobre todo en los departamentos de Salto, Artigas, Paysandú y en menor medida en Durazno (MGAP, DIEA, 2017). Uruguay exporta productos ovinos, lana y carne, a diversos mercados; el rubro ovino integra el sector agropecuario exportador y tiene larga trayectoria en el país (MGAP, DIEA, 2016). Anualmente se producen 37 mil toneladas de carne ovina y 27,7 toneladas de lana, ingresando al país 79 millones de dólares; estas cifras representan 3,8% del PBI total agropecuario (MGAP, DIEA, 2016). La producción de carne ovina ha tenido un auge luego de la disminución de los precios internacionales de la lana y hoy Uruguay es el tercer país exportador de carne ovina a nivel mundial, detrás de Australia y Nueva Zelanda.

El stock ovino ha decrecido considerablemente desde el año 1990; actualmente hay 6,7 millones de cabezas (DIEA, 2017), lo que significa un decrecimiento del 70 % desde el año 1990 a la actualidad.

Debido a la caída estructural de los precios de la lana, y al aumento en la superficie dedicada a actividades más rentables como la producción de carne vacuna, cultivo de soja y forestación, la producción ovina ha sido desplazada a suelos relativamente pobres, donde las características del suelo, la topografía y la producción y calidad del forraje, limitan la potencialidad productiva del ovino (Cardellino, 2015). Esta situación se complejiza aún más en invierno, ya que la producción y calidad de forraje del campo natural es menor (Berettay col., 1994) lo que limita la ingestión de nutrientes. En forma especial, la situación de las ovejas gestantes es crítica en estos periodos debido al aumento de sus requerimientos como consecuencia de las demandas de un feto en crecimiento. Por ende, los fetos de las ovejas gestantes son susceptibles a padecer subnutrición durante su gestación, la cual puede alterar su crecimiento y desarrollo, pudiendo afectar su productividad posterior durante la vida extrauterina.

Las restricciones nutricionales son una de las principales limitantes en los sistemas pastoriles de producción animal. A lo largo de las últimas décadas se ha comprobado que la programación fetal por subnutrición (es decir, los efectos debidos a la subnutrición durante etapas tempranas de la vida con consecuencias posteriores) tiene efectos que muchas veces son poco intensos o evidentes, pero que pueden terminar afectando de manera relevante a los individuos en etapas muy posteriores a las de la carencia nutricional que las origina (Barker, 2004). Los efectos de la programación fetal por subnutrición sobre el testículo ovino ya han sido demostrados por nuestro equipo, (Bielli y col., 2002), sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos involucrados. En la presente investigación estudiamos los efectos de la programación fetal por subnutrición en fetos ovinos. Esta tesis es el resultado de la cooperación entre investigadores de las Facultades de Agronomía y Veterinaria. Los experimentos a campo fueron conducidos en la Estación

Experimental Bernardo Rosengurtt, Cerro Largo, Facultad de Agronomía, mientras que la mayor parte de las actividades de laboratorio lo fueron en la Facultad de Veterinaria. Combina algunas variables clínicas y productivas con una serie de variables histológicas cuantitativas clásicas. De esta manera, se ha generado información científica original que resulta de interés tanto en aspectos de ciencias básicas como para la realidad productiva de nuestro país.

Por otra parte, la histología cuantitativa es la aplicación de un conjunto de técnicas cuantitativas al análisis histológico. Esto permite detectar diferencias no siempre evidentes al ojo humano durante la observación cualitativa, por más entrenado en evaluación histológica que se encuentre dicho observador. Además, los datos cuantitativos generados son pasibles de análisis estadístico de manera práctica y detallada. Aunque tiene la desventaja de ser un encare que consume muchas horas de trabajo, permite generar mucha información original interesante con costos relativamente bajos. En la presente tesis, hemos decidido aplicar estas técnicas, teniendo presentes sus ventajas y desventajas.

ANTECEDENTES

Programación fetal

El concepto de programación fetal deriva de estudios epidemiológicos en humanos que dieron origen a la teoría del origen fetal de enfermedades en los adultos. En efecto, la hipótesis de Barker se origina de asociar bajos pesos al nacer en humanos recién nacidos producto de subnutrición de las madres, con mayor incidencia en enfermedades cardiovasculares en los adultos (Barker, 2003).

El término “programación fetal” describe consecuencias permanentes generadas por efectos ambientales que actúan durante etapas claves del desarrollo temprano en la vida del animal (Rhind y Rae., 2001). La subnutrición de la madre puede afectar al feto programando el desarrollo de órganos, alterando la cantidad de células, o la expresión de receptores hormonales clave para la fisiología del órgano en cuestión (Rhind y Rae 2001). Si la madre sufre restricción nutricional durante la gestación o la lactancia, puede afectarse el desarrollo de sus crías con consecuencias en etapas posteriores ya que interfiere en el normal desarrollo de órganos y tejidos, provocando efectos permanentes o de muy difícil compensación (Desai y Hales, 1997). Estos efectos pueden prolongarse y manifestarse incluso hasta la vida adulta (Engelbregt y col., 2000). En términos generales, puede decirse que el mecanismo que explica estos fenómenos se basa en que el feto se adapta a la falta de nutrientes u oxígeno disminuyendo la tasa mitótica, y esto es más intenso en los tejidos que están en rápida división celular en el período de la restricción nutricional. Este fenómeno afecta en general a los mamíferos, y se ha confirmado tanto en ovinos como en humanos y animales de laboratorio (Swali y col., 2012). El impacto de la subnutrición depende del momento en que ésta se produzca y de la intensidad de la misma, ya que el desarrollo de los órganos tiene tiempos diferentes (Burton y Fowden, 2012).

Realidad productiva uruguaya para los ovinos y subnutrición

En Uruguay la producción ovina se desarrolla mayoritariamente sobre campo natural (CN), con limitaciones vinculadas a la cantidad y el valor nutritivo del forraje disponible (Berretta y col., 1994). La producción de forraje en CN varía en forma estacional (ver Figura 1), con marcados descensos en disponibilidad y calidad durante el invierno (Carámbula, 1991), lo que puede conducir a períodos de subnutrición, en especial en hembras gestantes. Dado que generalmente las encarneradas ocurren en otoño y que la gestación ovina dura aproximadamente 148 ± 2 días (Jainudeen y Hafez, 1996), esta crisis invernal del CN podría tener consecuencias de largo plazo sobre el desarrollo del feto ovino.

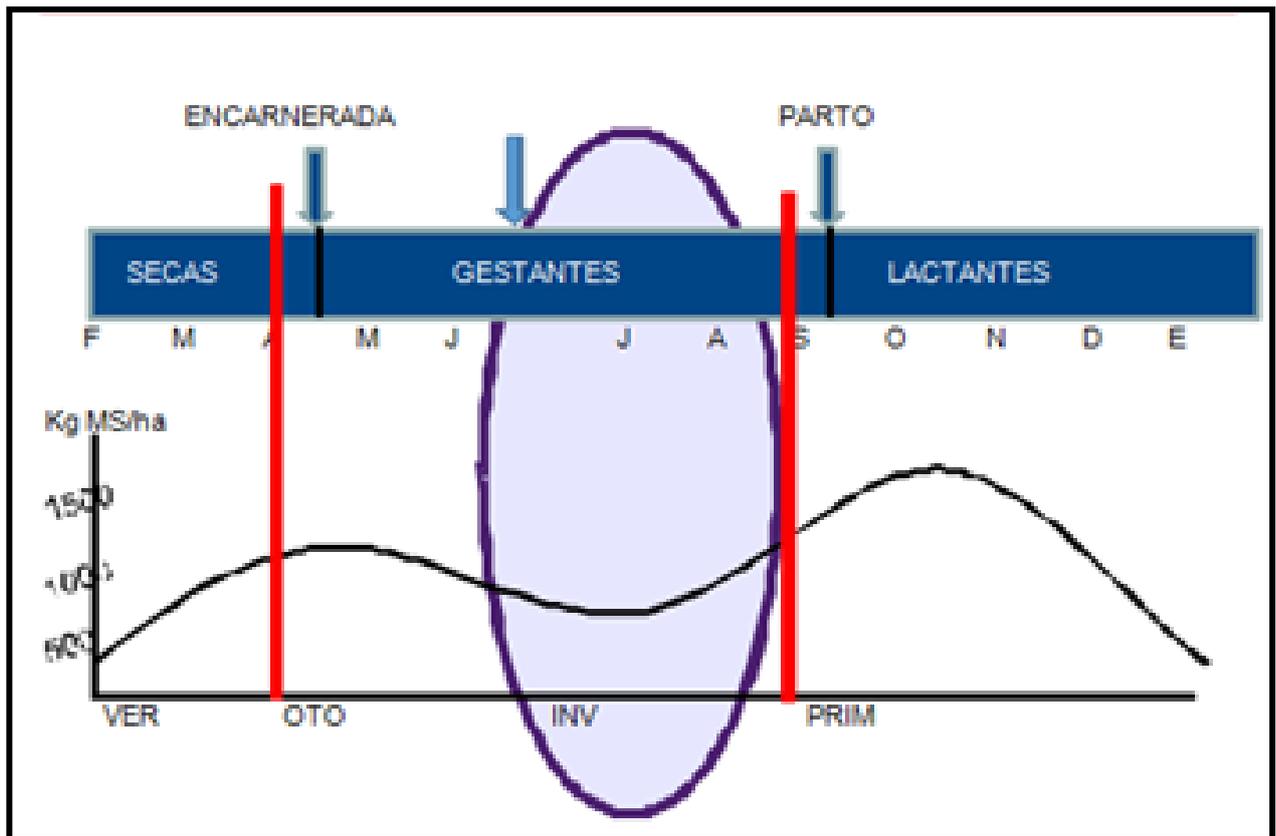
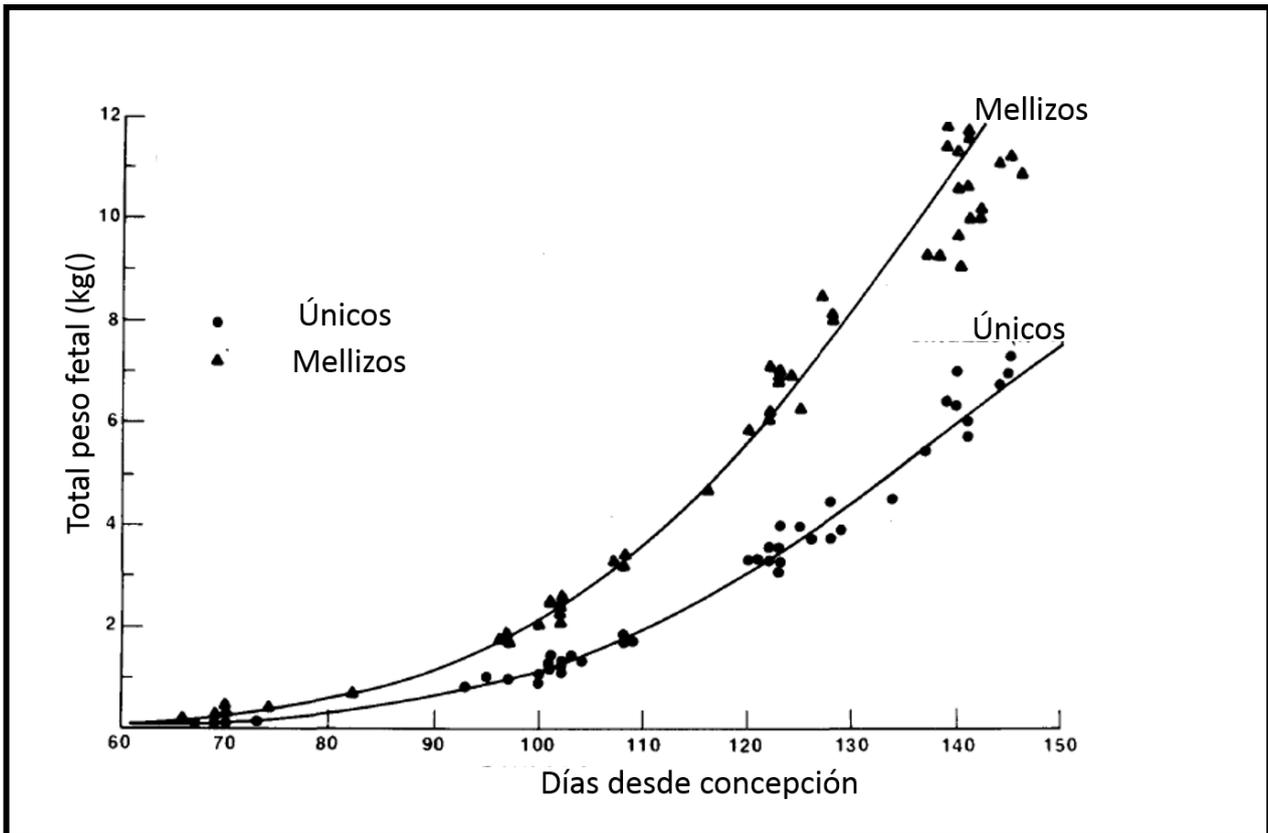


Fig. 1. Producción mensual promedio de forraje (kg de materia seca por hectárea) del campo natural y ciclo reproductivo de la oveja. Las dos barras rojas verticales corresponden al inicio y al final del tratamiento experimental aplicado en esta tesis (ver Materiales y Métodos).

Tomado de Abud, 2015

El crecimiento del peso fetal durante la vida uterina fue estudiado por Koongy col. (1975) en ovejas Targhee que fueron sacrificadas a los 70, 100, 125 y 140 días de gestación en ovejas con fetos únicos y mellizos. Observaron que el crecimiento del peso fetal se vuelve exponencial durante el último tercio de gestación (Figura 2).

Figura 2. Crecimiento fetal desde el día 60 hasta el parto en ovejas Targhee con fetos únicos o mellizos.



Adaptado de Koong y col., 1975

Trabajos nacionales demostraron que una baja oferta de forraje de campo natural en ovejas gestantes produce retardo en el crecimiento intrauterino de las crías, las que nacen con menor peso, alteración de las dimensiones corporales e índice de Gootwine más bajo (Abud, 2015). Estos efectos no se compensan con un aumento del plano nutricional durante los últimos 23 días antes del parto (Abud, 2015). Estos trabajos llevaron a generar la hipótesis de que el feto bajo condiciones de restricción nutricional prioriza los órganos del sistema nervioso central y sacrifica los órganos metabólicos como el hígado, los reproductivos como testículo y genitales externos y los que componen la carcasa, fundamentalmente los músculos (Abud, 2015).

Desarrollo reproductivo e histología testicular

El testículo es la gónada masculina, principal órgano reproductor del macho que produce los gametos masculinos (espermatozoides) y los esteroides sexuales (por revisión, ver Wrobel y Dellmann, 1993). Los testículos están alojados en las bolsas escrotales.

Los principales componentes estructurales del testículo son los siguientes:

- El testículo está delimitado por una cápsula compleja, que incluye tres componentes o subcapas:
 - 1) Túnica vaginal propia o subcapa serosa visceral.

2) Subcapa albugínea: Envuelve a todo el parénquima testicular, es la que le da la forma ovoidea al testículo. De su cara interna surgen una serie de tabiques conjuntivos densos, que subdividen al parénquima testicular seminífero en lobulillos.

3) Subcapa vascular, constituida por la arteria espermática y las venas capsulares testiculares.

- Dentro de la antedicha cápsula, se encuentra un parénquima testicular constituido, en el caso del carnero, en 85-90 % por el denominado parénquima seminífero, que es el que produce espermatozoides. El resto está constituido por el mediastino testicular y los conductillos eferentes.
- El parénquima seminífero aloja:
Túbulos seminíferos contorneados, que incluyen al tejido limitante del túbulo seminífero y al epitelio germinal. Este último es un epitelio estratificado complejo, con células de Sertoli (células de sostén) y células germinales o espermatogénicas. El epitelio germinal rodea una luz de límites irregulares, la luz del túbulo seminífero, a donde las células de Sertoli segregan un fluido testicular. En dicho fluido son liberados los espermatozoides testiculares. La mayoría de los túbulos seminíferos contorneados finalizan desembocando en túbulos seminíferos rectos, en la vecindad de la rete testis (se dirigen hacia el centro del lóbulo donde se anastomosan).
- Entre los túbulos seminíferos contorneados se encuentra el intersticio testicular. Se trata de un tejido conjuntivo laxo muy vascularizado, rico en vasos sanguíneos y linfáticos de pequeño calibre. Los principales tipos celulares presentes son las células intersticiales de Leydig, que son células epiteliales de actividad endócrina, y los macrófagos testiculares, que regulan la actividad de las células de Leydig, y también moderan fuertemente las respuestas inflamatorias testiculares.
- Los túbulos seminíferos rectos son la continuación de los túbulos seminíferos contorneados, permitiendo la conexión con la rete testis.
- Mediastinum testis y septula testis: son engrosamientos de la albugínea. Los septula testis o tabiques testiculares de tejido conjuntivo denso, surgen de la cara interna de la albugínea y subdividen al parénquima testicular. Convergen en el mediastino testicular, que también tiene un estroma de tejido conjuntivo denso.
- Rete testis: produce la mayoría del fluido testicular, en el carnero son aproximadamente 40ml/día del mismo; en la rete testis desembocan los túbulos rectos, los cuales se continúan con los conductillos eferentes.
- Conductos (o conductillos) eferentes: son entre 8 y 25, agrupados en pequeños lóbulos, están encargados de conectar la rete testis con el conducto epididimario; los conductos eferentes y las porciones iniciales del conducto epididimario constituyen la cabeza del epidídimo.

Fuera del testículo, se encuentra:

- El epidídimo: órgano sexual accesorio y dinámico dependiente de andrógenos testiculares, en el cual hay varios conductos eferentes y un largo y enrollado conducto epididimario. A su observación macroscópica observamos una cabeza, un cuerpo y una cola. Los espermatozoides son madurados y

transportados a lo largo del epidídimo, y se almacenan en la cola epididimaria a la espera de ser eyaculados.

- Conducto deferente: continuación del conducto epididimario, es la vía por la cual son eyaculados los espermatozoides.

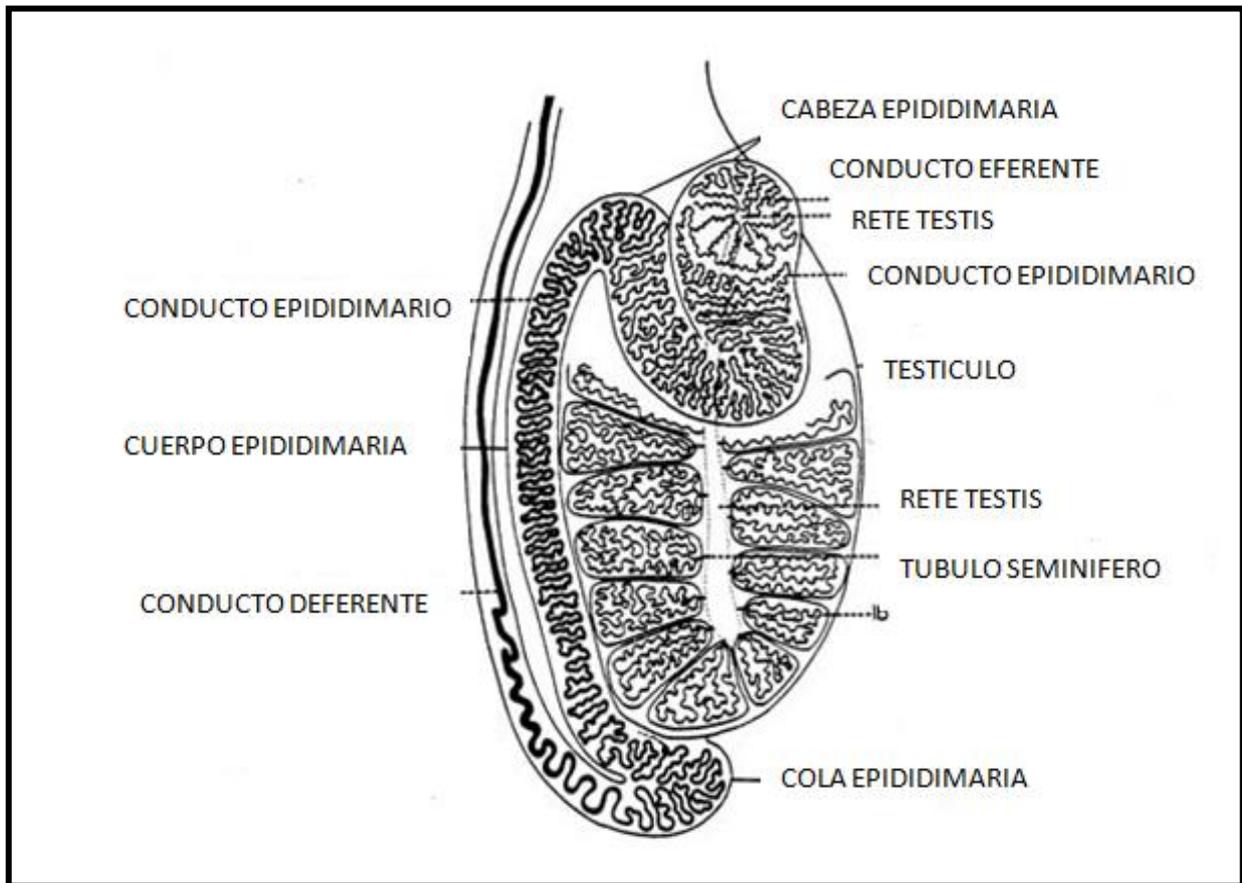


Fig. 3. Esquema del testículo ovino y órganos vecinos. Se observa el mediastino testicular a lo largo del eje mayor del testículo y los túbulos seminíferos agrupados en lobulillos.

Fuente: http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/ansci_repro/lec/handouts/hd2.html

El testículo es una glándula mixta (endócrina y exócrina) que produce hormonas, la testosterona y la inhibina entre otras y que se considera exócrina por su producción de espermatozoides, que son transportados fuera del testículo en un fluido testicular (Wrobel y Dellmann, 1993).

Las gónadas masculinas no tienen una función autónoma ya que dependen del eje hipotálamo-hipófiso-testicular. El hipotálamo se encarga de segregar la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), provocando que la adenohipófisis libere la hormona folículo estimulante (FSH), que actúa sobre las células de Sertoli (células de sostén). Estas células de Sertoli derivan de las células de soporte indiferenciadas (células sustentaculares o células de Sertoli inmaduras) de las gónadas en etapas anteriores a la pubertad (ver Tan y col., 2005). Las células de Sertoli están localizadas en los túbulos seminíferos, estimulan y controlan la espermatogénesis. Por otra parte, los túbulos seminíferos sólo existen a partir de la pubertad, cuando las células de Sertoli maduran, se ramifican y comienzan a segregar fluido testicular, lo que origina la luz de los túbulos seminíferos. Antes de

eso, las células de Sertoli inmaduras tienen perfil cilíndrico no ramificado, no segregan fluido testicular, y están alojadas en estructuras macizas, los cordones testiculares o cordones sexuales. En este trabajo de tesis, dado que hemos experimentado con fetos ovinos, se presentan resultados de la evaluación de testículos inmaduros, que contienen cordones testiculares.

La hormona luteinizante (LH) actúa sobre las células de Leydig (células intersticiales). Las células intersticiales tienen dos generaciones, las células fetales y las pubertales; ambas se desarrollan a partir de precursores mesenquimatosos, ubicados en el intersticio testicular, estimulando la biosíntesis de testosterona (andrógenos testiculares).

La producción de la testosterona es esencial para estimular el crecimiento y el mantenimiento de las glándulas accesorias masculinas, controlar la espermatogénesis junto con la FSH, brindar el comportamiento sexual masculino, realizar una retroalimentación negativa en la hipófisis y el hipotálamo, y además tiene efectos anabólicos generales.

El diámetro de los túbulos seminíferos y de los cordones testiculares es un buen indicador del desarrollo del compartimento productor de espermatozoides, mientras que la proporción entre dicho compartimento y el intersticio testicular indica el grado de maduración del testículo durante su desarrollo: cuanto mayor la proporción de túbulo seminífero con respecto al intersticio, más avanzadas la pubertad y la pospubertad (Hochereau-de Reviers y col., 1987).

Programación fetal por subnutrición

Las células de Sertoli sólo se reproducen normalmente durante la vida fetal y postnatal, hasta poco antes de iniciarse la pubertad (Steinberger y col., 1971). A su vez, el número de células de Sertoli está altamente correlacionado con el tamaño testicular adulto y con la producción máxima de células germinales y espermatozoides en gran variedad de mamíferos (Sharpe, 1995). Estas dos características de las células de Sertoli las convierten en candidatas a ser afectadas por programación fetal, ya que cualquier efecto ambiental que disminuya la tasa de proliferación de las células de Sertoli que actúe entre la vida fetal temprana y la pubertad podría inducir un menor número de estas células en el individuo adulto, y por lo tanto, con menor capacidad para producir espermatozoides.

La literatura es ambigua sobre los efectos de la subnutrición materna y su impacto sobre el desarrollo testicular. Algunos autores concluyeron que la subnutrición durante la gestación no afectó el número de células de Sertoli, ni el tamaño testicular durante el período medio de la gestación ovina; tampoco observaron efectos sobre la producción de semen en la etapa adulta de carneros (Rae y col., 2002b). Por otra parte, Rae y col., (2002a) determinaron que hay una disminución transitoria de la sensibilidad hipofisiaria a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) sin diferencias en la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH, ni diferencias sobre la calidad del semen, pulsos de LH o el perímetro escrotal. Por lo que estos autores concluyeron que una subnutrición en ovejas gestantes no tendría efectos reproductivos permanentes en la cría macho. Sin embargo, Bielli y col (2002) al comparar ovejas gestantes estabuladas sometidas a 110 y 70% de los

requerimientos de energía metabolizable, observaron que mientras el peso testicular de sus corderos no fue afectado, las crías de madres restringidas experimentaron una disminución del volumen de cordones testiculares y del número de células de Sertoli, lo que podría inducir una menor capacidad de producción de espermatozoides una vez que estos animales lleguen a la vida adulta. Posteriormente, Kotsampasi y col. (2009) confirmaron este efecto encontrando menor número de células de Sertoli en carneros adultos jóvenes, en condiciones de estabulación Genovese y col. (2010) realizaron un estudio en ratas machos adultos jóvenes (100 días de nacidos) hijos de madres subnutridas durante el periodo de gestación y lactación, y también observaron una disminución del número de células de Sertoli, llegando a la conclusión que estos machos producirían menor cantidad de espermatozoides.

La carencia energética en la dieta no es el único factor estudiado: Ramos y col. (2006) y Toledo y col. (2011), encontraron que cuando se somete ratas hembras lactantes a una dieta baja en proteínas entre el parto y el destete, esto determina cambios estructurales en el desarrollo testicular cuando las crías alcanzan la adultez. Por su parte, Muzi-Filho y col. (2015) observaron que ratas macho sometidas a una dieta hipoproteica durante la etapa de gestación presentaron una disminución de la fertilidad y fecundidad cuando llegaron a su edad adulta comparadas con los grupos controles.

El efecto que la subnutrición de hembras gestantes produce en el aparato reproductor de sus crías va a depender del momento de la preñez en que se produzca la injuria (Rae y col., 2002b; Raey col., 2002). Esto puede deberse a que según se va desarrollando el aparato reproductor hay períodos críticos que se inician entre los días 23 a 35 en el feto ovino, cuando comienza la diferenciación testicular seguida por la activación de las enzimas de la esteroidogénesis. En el segundo mes de gestación, las células primordiales migran hacia la cresta genital y el testículo fetal comienza a secretar testosterona. Aproximadamente a los 35 días aparecen las primeras células de Sertoli, mientras que las de Leydig comienzan a observarse una semana después. Posteriormente se desarrollan las glándulas vesiculares y alrededor del día 45-50 comienza la diferenciación del pene. Paralelamente, la porción del conducto mesonéfrico más cercana al testículo aumenta rápidamente de longitud, se enrolla progresivamente y se diferencia al epidídimo fetal (Davies y Davies, 1950).

Las neuronas hipotalámicas secretoras de la hormona GnRH se desarrollan entre el primer y tercer mes de gestación. Al momento de nacer el sistema reproductivo está casi completo. Las células de Sertoli continúan dividiéndose durante toda la etapa fetal hasta los 40-80 días de la vida posnatal, cuando su población alcanza el máximo y cesan definitivamente su proliferación. Este aspecto termina siendo de gran importancia, ya que cada célula de Sertoli tiene una capacidad limitada para apoyar metabólicamente a las células germinales vecinas (Russell, 1993) por lo tanto el tamaño de la población de células de Sertoli determina el potencial máximo de producción diaria de espermatozoides de un animal.

Cuando comparamos dos ofertas de forraje de campo natural (5-8 % vs 10-12%) desde 23 días antes de la concepción hasta 23 días antes del parto y luego un período en que a ambos grupos se les aportó un mejor plano nutricional, los datos preliminares del experimento descrito en esta tesis indicaron una reducción del peso

testicular de los corderos nacidos de las madres pastoreando baja oferta (Pérez-Clariget et al., 2016). La diferencia en la oferta de forraje también determinó una diferencia del peso al nacer del 11% a favor de los corderos de alta oferta y se observó una menor priorización del aparato reproductor y del sistema muscular en los corderos nacidos de las madres pastoreando baja oferta de forraje (Abudy col., 2014). En particular, los genitales externos (evaluados como longitud del pene, y ancho y longitud del escroto) resultaron marcadamente menores en los fetos y corderos hijos de madres de baja oferta nutricional (Bielliy col., 2013). Las diferencias en los resultados de los distintos trabajos pueden, en parte, ser explicadas por los diferentes regímenes nutricionales y las condiciones en que los trabajos se llevan a cabo. Los animales sometidos a pastoreo gastan energía en caminar, pastorear, tomar agua, pero además, en los meses de invierno, las bajas temperaturas provocan pérdidas de energía para mantener la temperatura corporal. Por lo tanto, los tratamientos restrictivos parecen amplificarse en estas condiciones. Las células de Sertoli son fuertes candidatos para sufrir efectos de programación fetal porque su período de proliferación mitótica comienza en la etapa fetal y cesa definitivamente en las primeras semanas de vida, influyendo en el tamaño testicular y cumpliendo una función fundamental en la espermatogénesis.

Consecuencias intrauterinas y extrauterinas al restringir el plano nutricional

La restricción de crecimiento intrauterino causada por la desnutrición materna se ha asociado en humanos con diabetes tipo 2 y resistencia a la insulina (Vuguin, 2004) y (Green, 2010), alta presión en sangre, (McMillen, 2001) obesidad, (Bol, 2009), síndrome metabólico, (Wang, 2012) y osteoporosis (Cooper y col., 1995; Cooper y col., 1997; Hernandez y col., 2003).

La restricción al crecimiento intrauterino causada por la desnutrición materna también afecta al feto ovino en su crecimiento tímico y desarrollo estructural (proporción longitud corporal y longitud de miembros locomotores (Osgerby, 2002). La desnutrición postnatal temprana puede dañar al sistema inmune e incluso llevar a cambios patológicos irreversibles, (Eleftherlades, 2006) que están relacionados con un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad perinatal (Osgerby, 2002).

Debido a los antecedentes anteriormente nombrados nos planteamos desafiar dos ofertas de forraje de CN que determinaran planos nutricionales diferentes durante la primera mitad de la gestación en ovejas y evaluar la influencia en el crecimiento y desarrollo testicular de fetos machos únicos de 70 días.

HIPÓTESIS GENERAL

La oferta de forraje de campo natural durante la gestación en ovejas afecta el desarrollo testicular de las crías.

OBJETIVOS GENERALES

Determinar si la baja oferta de forraje de campo natural en ovejas gestantes afecta el desarrollo del testículo de las crías.

HIPÓTESIS PARTICULAR

Una baja oferta de forraje de campo natural en ovejas gestantes produce cambios histomorfológicos en los testículos de fetos únicos de 70 días.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar si una baja oferta de forraje de campo natural en ovejas gestantes induce diferencias en:

- Peso del útero, del feto, de la carcasa fetal.
- Peso del testículo.
- Diámetro, volumen porcentual, volumen absoluto y longitud de los cordones testiculares y del intersticio testicular.
- El número de las poblaciones de células de Sertoli y gonocitos (número por corte y número total).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización, animales, diseño experimental y tratamientos

El trabajo de campo se realizó desde marzo a junio del 2013 en la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt, Facultad de Agronomía, Cerro Largo (31°5' LS, 54°15' LW). El protocolo experimental fue aprobado por la Comisión de Experimentación Animal (CEUA) de la Facultad de Agronomía, Udelar (Res. 477 del CF del 29/04/2013). Al inicio del experimento, 355 ovejas Corriedale, multíparas cuyo peso y condición corporal (CC, escala de 1 = emaciada a 5 = obesa; Jefferies, 1961) eran: $48,9 \pm 0,3$ kg y $2,74 \pm 0,02$ fueron utilizadas en un diseño de bloques completos al azar. En marzo (estación reproductiva), 23 días antes de la inseminación artificial (IA) fueron asignadas al azar, teniendo en cuenta su peso y CC, a uno de los siguientes planos nutricionales: Grupo alta oferta de forraje (AOF, n=178): estas ovejas pastorearon sobre campo natural a 10 kg de materia seca (MS)/ 100 kg de peso/día y Grupo baja oferta (BOF; n=157): 5 kg MS/100 kg de peso/día. Para aplicar los tratamientos, se utilizaron en total 32 ha de campo natural pertenecientes a la unidad Fraile Muerto, divididas en 6 parcelas separadas por alambrado eléctrico teniendo en cuenta la topografía, de tal manera que se contó con 3 parcelas por tratamiento. El diseño experimental fue de bloque al azar con tres repeticiones. El pastoreo fue continuo y los animales tenían libre acceso al agua.

La metodología de ajuste de la oferta de forraje se describe en Abud (2015). Brevemente, la disponibilidad (MS/ha) fue estimada utilizando el método de doble muestreo (Haydock y Shaw, 1975), utilizando una escala de 5 puntos estimada por apreciación visual, según la heterogeneidad de la pastura. La altura de la pastura se determinó mediante tres mediciones dentro del rectángulo (50 x 20 cm) en forma diagonal antes de realizar el corte en cada punto de la escala. Se estimó la altura promedio y la escala promedio de las parcelas (80-100 mediciones). Las muestras se pesaron en fresco y luego de 48 h en estufa a 60°C hasta lograr peso constante. Con la información de la cantidad de MS se estimó la disponibilidad de forraje por ha. Para el ajuste de forraje se utilizaron animales volantes pertenecientes a la misma majada y de similar peso y condición fisiológica que las ovejas experimentales. Se analizó la composición química en muestras de pasturas de cada parcela y se estimó el balance energético y proteico de los animales. En el Cuadro 1 se presenta la disponibilidad y altura del forraje y los requerimientos energéticos y proteicos cubiertos por las dos ofertas de forraje.

Cuadro 1. Disponibilidad y altura del campo natural, y requerimientos energéticos y proteicos cubiertos con la oferta de forraje de los tratamientos aplicados.

Tratamiento	Mes	Disponibilidad (km MS/ha)	Altura(cm)	Requerimientos	
				Energéticos	Proteicos
AOF	Marzo	1599,2±35,3	10,0±1,0	136%	108%
	Mayo	1752,8±268,5	15,5±1,5	126%	99%
BOF	Marzo	1599,2±35,3	10,0±1,0	106%	102%
	Mayo	1232,7±59,5	11,6±0,1	83%	70%

Adaptado de Abud (2015)

El celo se sincronizó con dos dosis de un análogo de prostaglandina F_{2α} (10 mg, Dinoprosttromethamine, Lutalyse, Pfizer, Kalamazoo, MI, USA), separadas por 10 días. Las ovejas fueron inseminadas por vía cervical utilizando semen fresco de tres carneros distribuidos homogéneamente entre los tratamientos y bloques. El diagnóstico de gestación y la carga fetal se determinaron por ecografía a los 30 días, utilizando ultrasonografía transrectal (AlokaProSound 2, Aloka Co., Ltd., Tokio Japón, y sonda de 7,5 Mhz). Las ovejas que no quedaron preñadas fueron eliminadas del experimento. A los 60 días se reconfirmó la gestación y carga fetal y se realizó el diagnóstico del sexo fetal. A los 70 días de gestación (rango: 69-71 días), 18 ovejas (9 por tratamiento y 3 por parcela) gestantes de fetos machos únicos, fueron sacrificadas por faena humanitaria (insensibilización previa al desangrado y consumo posterior) y se extrajo el útero grávido.

Registros, muestreos y análisis

Se registró el peso y la CC de las madres cada 30 días y antes del sacrificio, así como el peso del útero grávido, del feto y de la carcasa fetal.

El peso del testículo izquierdo fue registrado previo a ser fijado en solución de Bouin. También se registró el peso del testículo derecho, y se estimó el peso testicular total.

Las muestras de parénquima testicular fetal fueron procesadas histológicamente (deshidratación en etanol, inclusión en parafina, microtomía a 5µm de espesor, coloración con hematoxilina-eosina).

Se determinó el diámetro de los cordones testiculares en 30 secciones transversales/testículo. También se determinó el volumen porcentual ocupado por cordones testiculares y por intersticio testicular aplicando una grilla de 120 puntos sobre cada una de 30 imágenes de parénquima testicular/testículo. Se contó el número de núcleos correspondientes a células sustentaculares (células de Sertoli inmaduras)/sección de cordón testicular (30 secciones/testículo). Dicho número se utilizó para estimar el número total de células de Sertoli/testículo, según la fórmula (Marshall y Plant, 1996):

- Nro. células de Sertoli = N_s (L/espesor de la sección histológica)
- $L = V_s / (\pi[D/2]^2)$
- $V_s = (\%VCT \times \text{peso testicular})$

Donde:

- N_s = número de células de Sertoli/sección de cordón testicular
- L = longitud del cordón testicular
- V_s = volumen absoluto de los cordones testiculares
- $\%VCT$ = volumen porcentual de los cordones testiculares

Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados bajo un modelo de bloques completamente al azar utilizando el paquete estadístico SAS (SAS 9.0V; SAS Institute, Cary, NC, USA). El peso y la CC de las madres se analizaron como medidas repetidas utilizando modelos mixtos (procedimiento MIXED) con la edad de la gestación como factor de repetición. El modelo incluyó el efecto de la oferta de forraje, la edad de la gestación y la interacción entre ambos como efectos fijos, y el bloque como efecto aleatorio. Los valores de peso y CC previos a los tratamientos fueron utilizados como covariables en los respectivos modelos. La separación de medias se realizó por el test de Tukey. Los datos obtenidos en los fetos fueron analizados utilizando modelos mixtos (procedimiento MIXED). Los modelos incluyeron el efecto de la oferta de forraje como efecto fijo, y el bloque y el carnero como efectos aleatorios. La interacción tratamiento y bloque fue incluida en cada modelo como efecto aleatorio pero fue eliminada cuando el parámetro de la covarianza estimada fue cero o cercano a cero. Cuando el efecto del tratamiento fue significativo ($p \leq 0,05$) o se encontró una tendencia ($0.05 < p \leq 0.10$) se re analizaron los datos utilizando el peso testicular izquierdo y el peso fetal como covariables para estimar si las diferencias encontradas eran independientes del peso testicular o fetal. Se estudiaron las correlaciones de Pearson entre las variables estudiadas. Los datos se expresan como medias ajustadas \pm eem.

RESULTADOS

Peso y condición corporal de las madres

Los datos están reportados en Abud (2015). Brevemente, las ovejas del grupo AOF fueron más pesadas al final del tratamiento (AOF: $47,2 \pm 0,41$ kg vs. BOF: $44,7 \pm 0,41$ kg; $P=0,0024$) y tuvieron mayor CC (AOF: $2,69 \pm 0,01$ vs. BOF: $2,50 \pm 0,01$; $P < 0,0001$) que las del grupo BOF. Ambas variables fueron afectadas por los días de gestación ($P < 0,0001$) y la interacción entre tratamiento y días de gestación ($P < 0,0098$). Ambos grupos aumentaron de peso antes de la IA ($P < 0,05$), pero las de AOF llegaron con un peso mayor ($P < 0,05$) que las de BOF. Al momento del sacrificio (70 días de gestación), las ovejas de AOF estaban manteniendo peso y CC ($p > 0,1$) mientras que las de BOF estaban en balance energético negativo que se reflejó en pérdida de peso y CC ($P < 0,05$, Figura 4). Por lo que, al momento del sacrificio las ovejas de AOF eran más pesadas y tenían una CC mayor que las de BOF (AOF: $48,8 \pm 1,0$ kg y $3,0 \pm 0,06$ unidades vs. BOF: $45,3 \pm 0,9$ kg y $2,54 \pm 0,05$ unidades, PV y CC, respectivamente).

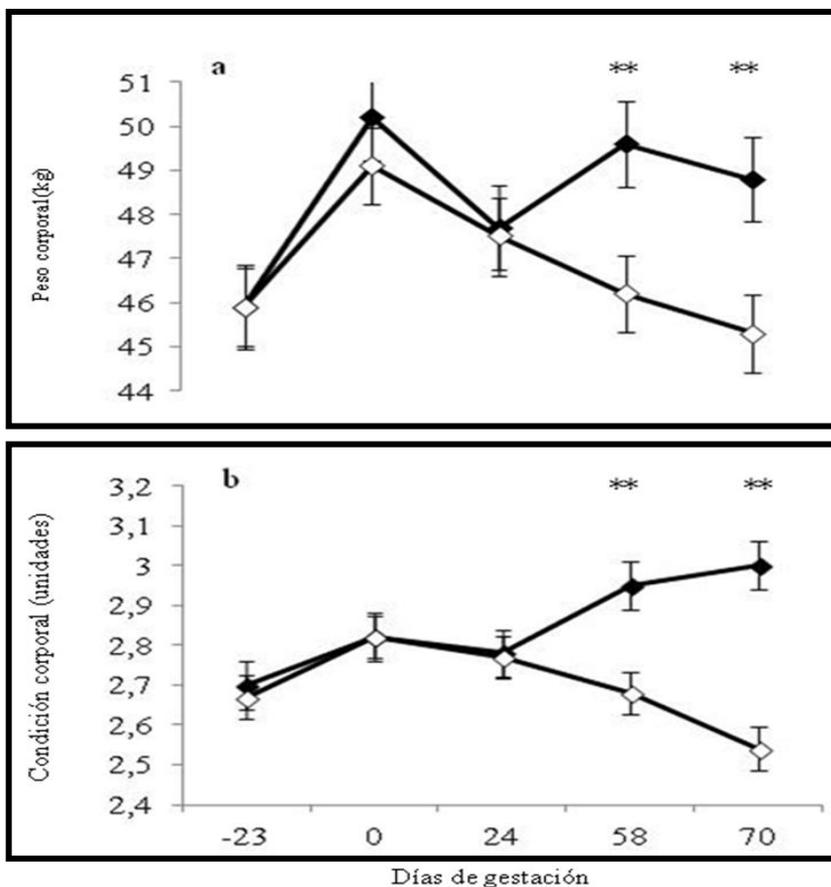


Figura 4. Peso (a) y condición corporal (b) de ovejas a las que se les ofreció 10 kg de materia seca (MS)/100 kg de peso/día (■) o 5 kg MS/100 kg de peso/día (□) de campo natural y sacrificadas a los 70 días de gestación. El día 0 corresponde al día de la concepción. Los asteriscos indican diferencias entre grupos dentro del mismo día de gestación ($P < 0,01$).

Tomado de Abud (2015)

VARIABLES registradas en los fetos

El Cuadro 2 presenta las medias y los valores de P para el efecto de tratamiento. El diámetro de los cordones testiculares tendió ($p = 0,08$) a ser afectado por el tratamiento por lo que se realizaron análisis de covariables. No se encontró efecto de tratamiento cuando el peso del testículo izquierdo fue utilizado como covariable ($p = 0,13$), pero la tendencia ($p = 0,06$) persistió cuando el peso fetal fue utilizado como covariable. El número de gonocitos por corte también tendió ($p = 0,07$) a ser afectado por el tratamiento y esta tendencia ($p = 0,1$) persistió cuando el peso testicular izquierdo fue incluido en el modelo como covariable.

Cuadro 2. Efecto del tratamiento sobre las variables estudiadas

VARIABLES	AOF	BOF	Valor de p
Peso fetal (gr)	1520,5 ± 3,6	1437,0 ± 3,0	0,11
Peso carcasa (gr)	799,83 ± 32,12	769,00 ± 31,23	0,22
Peso Testículo Izquierdo (gr)	0,0223± 0,0014	0,0206 ± 0,0014	0,42
Peso testicular total (gr)	0,0434 ± 0,0023	0,0410 ± 0,0023	0,4
Diámetro cordón (µm)	30,66 ± 0,56	29,18 ± 5,63	0,08
Volumen porcentual cordones testiculares(%)	0,01173 ± 0,00017	0,01102 ± 0,00017	0,49
Volumen absoluto cordones testiculares (mL x 10 ⁻³)	0,01173± 0,00168	0,01102 ±0,00017	0,18
Longitud de cordones(µm x 10 ⁶)	7,098 ± 0,454	0,006568 ± 0.454	0,42
Volumen porcentual intersticio (%)	47,16 ± 0,91	46,79 ± 0,91	0,78
Número de células de Sertoli por corte	10,49 ± 0.3013	10,42±0,30	0,88
Número total de células de Sertoli (x10 ⁶)	3,925± 0,029	4,278 ± 0,029	0,46
Gonocito por corte	3,132 ±0,143	2,737 ±0,143	0,07
Número total de gonocitos	7,119 ±1,093	6,751 ±1,093	0,82

Cuadro 3. Correlaciones significativas entre las variables estudiadas

	PESO FETAL	PTI	GC	SC	DC	V%C	V %I	VAC	LTS
PC	0,967 p<.0001								
SC			0,59 p=0,008						
DC			0.71 p=0.0008	0.70 p=0.001					
V%I		-0.49 p=0.05				-1,0 p=<.0001			
VAC		0.91 p=<.0001	0.42 p=0.08	0.51 p=0.028	0.68 p=0.001	0.52 p=0.03	-0.52 p=0.03		
LTS		1 p=<.0001				0.49 p=0.05	-0.49 p=0.05	0.91 p=<.0001	
NTS		0.95 p=<.0001		0.58 p=0.01		0.53 p= 0.03	-0.53 p= 0.03	0.95 p=<.0001	0.95 p=<.0001

Se considera correlación significativa si la $P \leq 0.05$.

- PC: peso de la carcasa
- PTI: peso testículo izquierdo
- GC: gonocito por corte
- SC: número de células de Sertoli por corte
- DC: diámetro de los cordones testiculares.
- V%C: volumen porcentual de los cordones.
- V%I: volumen porcentual del intersticio.
- VAC: volumen absoluto de cordones testiculares.
- LTS: longitud de los cordones testiculares.
- NTS: número total de células de Sertoli.

Como era de esperar, el peso de la carcasa presentó una alta y positiva correlación con el peso fetal. Por otra parte, el peso testicular izquierdo se correlacionó negativamente con el volumen porcentual del intersticio y presentó una alta correlación positiva con el volumen absoluto, la longitud de los cordones testiculares y el número total de células de Sertoli. El diámetro de los cordones presentó una correlación positiva con el número de células de Sertoli y de gonocitos por corte transversal de cordón testicular. El número de células de Sertoli por corte de cordón testicular se correlacionó positivamente con el número de gonocitos por corte.

Además, el número de células de Sertoli por corte de cordón testicular tendió a correlacionarse positivamente con el diámetro de los cordones testiculares, con el

volumen absoluto de cordones testiculares y con el número total de células de Sertoli.

DISCUSIÓN

Esta tesis de grado ha generado información original sobre los efectos de la subnutrición en condiciones extensivas durante la primera mitad de la gestación en fetos ovinos.

En cuanto al tratamiento aplicado, las ofertas de forraje ofrecidas a las ovejas determinaron que los requerimientos tanto proteicos como energéticos fueran cubiertos en el grupo de AOF durante todo el periodo estudiado. Mientras que las ovejas de BOF sufrieron una restricción del 20% y 30% de sus requerimientos energéticos y proteicos, respectivamente. Los tratamientos determinaron balances nutricionales diferentes que se reflejaron en el mantenimiento del peso y la CC en las ovejas de AOF y en una pérdida del 6% del peso y 5% de CC con respecto a los valores observados al momento de la concepción en las ovejas de BOF. A pesar de estas diferencias, no se observaron efectos importantes o generalizados del tratamiento aplicado sobre el desarrollo embrionario-fetal, al menos en las variables estudiadas.

Resulta interesante que el tratamiento no afectara ni el peso fetal ni el de la carcasa. Es de recordar que el período de estudio corresponde casi exactamente a la primera mitad de la gestación. Durante dicha etapa transcurre el desarrollo embrionario así como la primera parte del desarrollo fetal. En términos generales, las demandas nutricionales de un embrión son pequeñas (debido a su escaso tamaño), y resultan despreciables con respecto a las demandas nutricionales de la oveja en esta primera mitad de la preñez (Koong y col., 1975). Nosotros asumimos que las reservas corporales de la madre pudieron compensar el balance negativo de nutrientes y por lo tanto la madre pudo amortiguar el efecto sobre el embrión-feto de la restricción nutricional que estaba sufriendo.

El efecto de la restricción nutricional sobre el peso corporal fetal depende de la magnitud de la restricción. Se ha reportado que restricciones del 60 a 70% de los requerimientos en ovejas gestantes no influyen sobre el peso fetal ni a los 45 (Osgerby y col., 2002), 78 (Clarke y col., 1998) o 90 días de gestación (Osgerby y col., 2002). Sin embargo, restricciones mayores (50% de los requerimientos) disminuyen el peso del feto a los 78 días (Vonnahme y col., 2003; Zhu y col., 2004). Si bien, en los sistemas pastoriles como en el que se llevó a cabo esta tesis, las ovejas gastan energía en caminar para alimentarse, beber agua y los requerimientos para mantener la temperatura corporal son mayores, la restricción nutricional aplicada parece haber sido moderada, lo que explicaría que el peso fetal no fuera afectado.

La restricción a la que se sometió a las ovejas en esta tesis tampoco afectó el peso testicular fetal. El efecto de la restricción nutricional materna sobre el peso testicular parece estar influido por el periodo en que ésta se produce, más que por la magnitud de la restricción. Restricciones del 70% (Osgerby y col, 2002) y aún del 50% (Rae y col, 2002) no afectan el peso testicular en fetos de 45 a 90 días. Sin embargo, dicha restricción (50%) disminuye el peso testicular en fetos de 110 días. El peso testicular está altamente correlacionado con el peso corporal (Courot, 1971). Incluso Bielli y

col. (2002) encontraron correlación positiva entre el peso corporal y testicular en neonatos, donde se encontró efectos de la subnutrición aplicada durante toda la gestación y los dos primeros días post parto. Sin embargo, en el presente trabajo no se encontró una correlación entre el peso fetal y el testicular. Es posible que en esta etapa de la organogénesis fetal esta correlación no esté presente posiblemente porque el desarrollo testicular si bien ha comenzado, a los 70 días no está en la fase de mayor crecimiento. Además, no podemos descartar que el muy bajo peso de los testículos haya agregado un factor de error al pesarlos.

El peso corporal de la madre se correlacionó con el peso de la carcasa del feto, lo cual es algo esperable biológicamente, por lo que resulta esperable que madres más pesadas tengan fetos más pesados (Gardner y col., 2007).

Si bien no se observaron efectos sobre el peso testicular, la restricción nutricional a la que se sometieron las ovejas de BOF tuvo un leve efecto sobre el tejido productor de espermatozoides. En efecto, el diámetro de los cordones testiculares mostró una tendencia a ser afectado por el tratamiento y esta tendencia persistió cuando el peso fetal fue utilizado como covariable. El parénquima testicular parece ser sensible en etapas tempranas a restricciones nutricionales moderadas. Un menor diámetro de los cordones testiculares implica tener menor cantidad de células y por lo tanto esto estaría condicionando la potencialidad en la producción futura de espermatozoides, siempre y cuando se mantenga esta tendencia en etapas posteriores de la vida. Por otra parte, el efecto de la restricción nutricional no parece haber operado a través del peso fetal.

Si bien Bielli y col. (2002) encontraron que la subnutrición entre los 70 días de gestación y el parto provocó menor volumen de los cordones testiculares en corderos neonatos, en nuestras condiciones y en la edad fetal más temprana en la que se tomaron nuestras muestras (70 días, precisamente cuando comenzaba el tratamiento de Bielli y col, 2002), no fue posible observarlo. Esto podría ser atribuido a que solo se trabajó con fetos de primera mitad de gestación. Es posible que los resultados de Bielli y col (2002) se deban al efecto del tratamiento durante la segunda mitad de la gestación. Se explica así que en el resto de las variables en estudio (volumen porcentual y absoluto de los cordones testiculares, longitud de dichos cordones y volumen porcentual del intersticio testicular), con las condiciones de nuestro tratamiento, no se observen diferencias.

Es interesante tener presente que el número de células de Sertoli no fue afectado por el tratamiento nutricional. Sin embargo, el número de gonocitos por corte tendió a ser menor en los fetos de madres restringidas y esa tendencia persistió cuando el peso testicular se utilizó como covariable. Es decir, el efecto del tratamiento sobre los gonocitos parece amplificarse. Es posible, que exista una priorización dentro del propio tejido hacia determinadas líneas celulares. Considerando que las células descendientes de los gonocitos (es decir, las células de la línea germinal) retienen su capacidad de mitosis a lo largo de la vida adulta (Wrobel y Dellmann, 1993), mientras que las células de Sertoli la pierden en etapas tempranas posnatales (Hochereau-de Reviers y col., 1987), es posible que frente a una restricción nutricional, el testículo priorice la línea más sensible, es decir, la célula de Sertoli. Recordemos que las células de Sertoli dan soporte a la espermatogénesis y su número está altamente correlacionado con el tamaño testicular adulto (Sharpe y col 1995). Nosotros creemos que el tratamiento no afectó el número de estas células

porque el testículo recién empezaba su desarrollo y puntualmente estas células estaban empezando a multiplicarse. Es probable que un feto no jerarquice sus testículos frente a sus sistemas cardiovascular o nervioso. Ya está demostrado que el tratamiento de subnutrición durante toda la gestación afecta la estructura testicular, disminuyendo el número total de células de Sertoli por testículo en neonatos (Bielli y col. 2002) e incluso este efecto se mantiene hasta en etapas adultas (Kotsampasi y col. 2009). En otros modelos animales, como las ratas, también se encontraron datos consistentes con este efecto tanto en neonatos como en adultos (Genovese y col. 2010 y 2011).

En cuanto a los gonocitos, hay que tener en cuenta que el testículo está en etapas tempranas de su desarrollo, esto quiere decir que aún falta tiempo para que los gonocitos estén priorizados en el testículo. Sería bueno establecer si la tasa de multiplicación de estas y otras células se encuentra alterada aún cuando el número absoluto no sea diferente entre tratamientos. Tal vez en esta etapa de la vida esté alterada la tasa de mitosis sin observarse cambios en los números absolutos.

El número de células de Sertoli se correlacionó con el número de gonocitos por corte. Esto resulta esperable debido a que las células de Sertoli son las que marcan el desarrollo de los gonocitos. Recordemos que según Hochereau-de Reviers y col. (1987), cada célula de Sertoli tiene un techo máximo de células germinales (gonocitos) a las que puede apoyar metabólicamente.

Por otra parte, es esperable que el diámetro de los cordones testiculares esté correlacionado con el número de células de Sertoli y de gonocitos por corte, debido a que los componentes que hay dentro del cordón son estas células, por lo tanto a mayor cantidad de células dentro del cordón debe de existir mayor diámetro (Hochereau-de Reviers y col. 1987).

En cuanto a los volúmenes porcentual y absoluto de los cordones testiculares, así como al volumen porcentual de intersticio y a la longitud de los cordones testiculares, están correlacionados con el peso testicular total y peso testicular izquierdo, es decir que la composición anatómica del testículo es homogénea, cuando crece o se desarrolla el testículo también lo hacen las estructuras que lo componen de forma proporcional (Courot, 1971).

CONCLUSIONES

1) La subnutrición de la oveja gestante a partir de tres semanas antes de la concepción y durante los primeros 70 días de gestación determina efectos relativamente moderados sobre el desarrollo del testículo fetal.

2) A pesar de lo antedicho las tendencias encontradas en el diámetro de los cordones testiculares y el número de gonocitos por corte transversal de cordón testicular no permiten descartar que ya exista un débil efecto del tratamiento sobre el desarrollo testicular del feto.

En suma, los resultados encontrados en esta tesis indican que los primeros 70 días de gestación ovina son un período en que el crecimiento (medido por el peso) fetal corporal y testicular es relativamente poco sensible a la subnutrición.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abud, M.J., Bielli A., Alvarez Oxiley A., Freitas de Melo A., Ithurralde J., Ramirez S., Lopez Perez A., Pérez Clariget R. (2014). Efecto de dos ofertas de forraje en ovejas gestantes sobre el peso al nacimiento, el de la carcasa y el rendimiento en corderos neonatos. V *Congreso de la Asociación Uruguaya de Producción Animal*.
2. Abud M.J., (2015). Efecto de la oferta de forraje de campo natural sobre el desarrollo fetal de corderos con especial énfasis en el desarrollo muscular. *Tesis* (Facultad de Agronomía, Udelar, Uruguay).
3. Barker DJP (2003). The developmental origins of adult disease. *Eur J Epidemiol* 18: 733-736.
4. Barker DJ, (2004). The developmental origins of adult disease. *J Am Coll (Nutr. 23/6 Suppl.): 5885-5955*
5. Berretta, E.J. R. M.(1994). Natural pastures and sheep production in the Basaltic region in Uruguay. *IV World Merino Conference*. Montevideo. Pág.245-62.
6. Bielli A, Perez R., Pedrana G., Milton JTB., Lopez A., Blackberry MA., Duncombe G., Rodriguez Martinez H., Martín GB., (2002). Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reprod Fertil Dev* 14:333-337.
7. Bielli A, Genovese P., Riano V., Abud M., Alvarez Oxiley A., Ithurralde J., Lopez A., Pérez Clariget., (2013). La oferta de forraje afecta la longitud del pene y el tamaño del escroto en fetos ovinos de 70 días de gestación. XXIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA), Habana, Cuba, 18-22 noviembre 2013.
8. Bol V, D. R.(2009). Forced catch-up growth after fetal protein restriction alters the adipose tissue gene expression program leading to obesity in adult mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297:R291–R299
9. Burton GJ, Fowden AL.(2012). Review: The placenta and developmental programming: balancing fetal nutrient demands with maternal resource allocation. *Placenta*. 33Suppl:S23-7.
10. Carámbula M, (1991). Aspectos relevantes para la producción forrajera. Montevideo, INIA. Serie Técnica 19, 49 p.
11. Cardellino,(2015). Un rubro que decae globalmente. *El País Agropecuario*, Montevideo, UY.pág 74-76.
12. Clarke L, H. J.(1998). Maternal nutrition in early-mid gestation and placental size in sheep. *British Journal of Nutrition*. 79: 359-364.
13. Cooper C, C. B.(1995) Childhood growth, physical activity and peak bone mass in women. *J Bone Min Res*. 10:940–947.
14. Cooper C, F. E.(1997) Growth in infancy and bone mass in later life. *Ann Rheum Dis*. 56:17–21.
15. Courot M,(1971). Établissement de la spermatogénèse chez l'agneau (*Ovisaries*). Étude expérimentale de son contrôle gonadotrope; importance des cellules de la lignée sertolienne. Doctoral dissertation, Université de Paris VI. 200 p.
16. Davies J, Davies DV, (1950). The development of the mesonephros of the sheep. *Proceedings of the Zoological Soc of London* 120: 73–93.

17. Wrobel, K.H. y Dellmann, H-D, (1993). Sistema reproductor masculino. Pp. 245-265. *En: Histología Veterinaria*. Ed: Dellmann, H-D.
18. Desai M, Hales CN.(1997). Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 72: 329-348.
19. MGAP. DIEA Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. (2017). Anuario Estadística.
20. Engelbregt, M. J., Houdijk, M. E., Popp-Snijders, C., and Delmarre-van de Waal, H. A.,(2000). The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Res*. 48: 803-7.
21. Eleftherlades M, C. N. (2006). Fetal growth restriction and postnatal development. *N Y Acad Sci* 1092:319–3
22. Gardner DS, B. Z. (2007). Factors affecting birth weight in sheep: maternal environment. *Reproduction*. 133: 297–307.
23. Genovese P, N. P.(2010). Undernutrition during foetal and post-natal life affects testicular structure and reduces the number of Sertoli cells in the adult rat. *Reprod Domest Anim*. 45:233-6
24. Genovese P, R. B.(2011). Subnutrición durante la gestación y gestación más lactación y morfometría epididimaria en ratas neonatas y prepúberes. *XXII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA)*. Montevideo, Uruguay.
25. Green AS, R. L. (2010). Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function. *J Endocrinol* 205:211–224.
26. Haydock KP, Shaw NH. (1975). The comparative yield method for estimating dry matter yield of pastures. *Aust J Exp Agr Anim Husb*. 5: 663-670.
27. Hernandez CJ, B. C.(2003). A theoretical analysis of the relative influences of peak BMD, age-related bone loss and menopause on the development of osteoporosis. *Osteoporosis International*. 14:843–847.
28. Hochereau-de Reviers MT, M.C.(1987). Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *J Reprod Fertil Suppl* 34:101-14.
29. Jainudeen MR, Hafez ESE, (1996). Gestación, Fisiología prenatal y parto. *En: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Ed. E.S.E. Hafez. 6ª ed. Interamericana–Mc Graw-Hill, pp 203-224.
30. Jefferies BC,(1961). Body condition scoring and its use in management. *Tasmanian J Agr* 32: 19-21.
31. Kotsampasi B, B. P.(2009). Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero. *Anim. Reprod. Sci*. 114:135–147
32. Koong LJ, G. R. (1975). A Description of the Dynamics of Fetal Growth in Sheep. *J Anim Sci*. 41: 1065-1068.
33. Marshall GR, Plant TM, (1996). Puberty occurring either spontaneously or induced precociously in Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) is associated with marked proliferation of Sertoli cells. *Biol Reprod* 54:1192-1
34. McMillen IC, A. R. (2001). Fetal growth restriction: adaptations and consequences. *Reproduction*. 122:195–204
35. MGAP. DIEA Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (2016). *Anuario estadístico agropecuario*. Montevideo, 198 p.
36. Muzi-Filho H, S. B.(2015). Rats undernourished in utero have altered Ca²⁺ signaling and reduced fertility in adulthood. *Physiol Rep*. 3 (10): e12587

37. Osgerby, J.C., Wathes, D.C., Howard, D., Add, T.S. (2002). The effect of maternal undernutrition on ovine fetal growth. *J. Endocrinol.* 173: 131-141.
38. Rae, S. P. (2002). Effect of maternal undernutrition on fetal testicular steroidogenesis during the CNS androgen-responsive period in male sheep fetuses. *Reproduction* 124: 33–39
39. Rae MT, Rhind SM., Kyle C., Brooks AN., (2002a). Maternal undernutrition alters triiodothyronine concentrations and pituitary response to GnRH in fetal sheep. *J. Endocrinol* 173: 449-455.
40. Rae MT, K. M.(2002b). The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Anim Reprod Sci* 15: 72:63-71.
41. Ramos CF, S. C.(2006). Stereological evaluation of the seminiferous tubules of rats after maternal undernutrition during the lactation period. *Urol Int.* 76(1):63-6.
42. Perez Clariget, M. G. (2016) Pasture allowance during pregnancy affects the histology of the testes in newborn lambs. International Congress on Animal Reproduction (ICAR).
43. Russell LD, R.(1993). Form, dimensions, and cytology of mammalian Sertoli cells. *The Sertoli cell. Clearwater* pp. 1-37.
44. Rhind, SM. Rae, MT (2001). Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* 122(2):205-214.
45. Steinberger E, (1971). Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol Rev.* 51:1-22.
46. Swali A, M. H.(2012). Processes underlying the nutritional programming of embryonic development by iron deficiency in the rat. *Plos One* 7(10): e48133
47. Sharpe, R. M.(1995). Regulation of spermatogenesis. In the Physiology of reproduction. (Eds E. Knobil and J. D. Neill.) pp. 1363-434. (Raven Press: New York).
48. Tan KAL., Gendt K., Atanassova N., Walter M., Sharpe RM., Saunders PTK., Denolet E., Verhoeven G., (2005). The role of androgens in Sertoli cell proliferation and functional maturation: studies in mice with total or Sertoli cell-selective ablation of the androgen receptor. *Endocrinology* 146:2674-83.
49. Toledo FC, Perobelli JE., Pedrosa FPC., Anselmo Franci JA., Kempinas WDG., (2011). In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9:94.
50. Vonnahme KA, H. H.(2003). Maternal undernutrition from early- to mid-gestation leads to growth retardation, cardiac ventricular hypertrophy, and increased liver weight in the fetal sheep. *Biology of Reproduction*, 69: 133-140.
51. Vuguin P, R. L. (2004). Hepatic insulin resistance precedes the development of diabetes in a model of intrauterine growth retardation. *Diabetes* 53:2617–2622
52. Wang J, W. L.(2012). Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome. *Antioxid Redox Signal.* 17(2):282-301.
53. Zhu MJ, F. N. (2004). Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biol Reprod* 71: 1968-1973.

