



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

“Restricción del crecimiento intrauterino en ovejas: Roles de la subnutrición y la condición de mellicera”

Carolina Alejandra Rojas Toledo

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

PROFESOR GUÍA: Dr. VICTOR HUGO PARRAGUEZ GAMBOA

Proyecto FONDECYT 1160892

SANTIAGO, CHILE
2019



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

“Restricción del crecimiento intrauterino en ovejas: Roles de la subnutrición y la condición de mellicera”

Carolina Alejandra Rojas Toledo

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

NOTA FINAL:

PROFESOR GUÍA. : DR. VÍCTOR PARRAGUEZ G.

PROFESOR CORRECTOR : DRA. CAROLINA VALENZUELA V.

PROFESOR CORRECTOR : DR. HECTOR ADARMES A.

SANTIAGO, CHILE
2019

AGRADECIMIENTOS

A mi profesor guía, Víctor Parraguez Gamboa, por su preocupación, tiempo y dedicación durante el desarrollo de esta memoria.

A mi familia, en especial a mis padres Felipe Rojas R., María Toledo R. y hermano Felipe Rojas T., por su apoyo incondicional en mi vida y durante mi permanencia como estudiante de Medicina Veterinaria.

Finalmente a mis amigos que hicieron mi paso por FAVET una etapa llena de lindos momentos.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	5
2.	ABSTRACT	6
3.	INTRODUCCIÓN.....	7
4.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
4.1	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA PRODUCCIÓN OVINA EN LA REGIÓN DE MAGALLANES.....	8
4.2	IMPORTANCIA DE TENER DOS CRÍAS POR PARTO.....	8
4.3	INCIDENCIA DE LA GESTACIÓN MELLICERA Y LA SUBNUTRICIÓN MATERNA SOBRE EL PESO Y TAMAÑO FETAL DEL CORDERO.....	9
4.4	EFFECTO PESO Y TAMAÑO EN LA SOBREVIVENCIA Y CRECIMIENTO POSNATAL DEL CORDERO	9
4.5	BIOMETRÍA FETAL EN GESTACIÓN DOBLE Y SUBNUTRICIÓN MATERNA.....	10
5.	HIPÓTESIS	12
6.	OBJETIVO GENERAL.....	12
6.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
7.1	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	14
8.	RESULTADOS	15
8.1	EFFECTO DE LA GESTACIÓN MELLICERA Y LA SUBNUTRICIÓN MATERNA SOBRE EL PESO FETAL	16
8.2	EFFECTO DE LA GESTACIÓN MELLICERA Y LA SUBNUTRICIÓN MATERNA SOBRE EL PESO DE ÓRGANOS FETALES.....	16
8.3	EFFECTO DE LA GESTACIÓN MELLICERA Y LA SUBNUTRICIÓN MATERNA SOBRE LA RELACIÓN PESO ÓRGANO/PESO CORPORAL FETAL	22
9.	DISCUSIÓN.....	24
9.1	EFFECTO DE LA SUBNUTRICIÓN MATERNA Y TIPO DE GESTACIÓN SOBRE PESO Y CONDICIÓN CORPORAL MATERNA.....	24
9.2	EFFECTO DE LA SUBNUTRICIÓN MATERNA Y TIPO DE GESTACIÓN SOBRE PESO PLACENTARIO Y PESO FETAL.....	25
9.3	EFFECTO DE LA SUBNUTRICIÓN MATERNA Y TIPO DE GESTACIÓN SOBRE PESO ABSOLUTO Y RELATIVO DE ÓRGANOS FETALES.....	27
10.	CONCLUSIONES.....	33
11.	BIBLIOGRAFÍA	34

1. RESUMEN

La gestación de mellizos es una buena estrategia para incrementar la productividad y la rentabilidad en la industria ovina. Sin embargo, en la Patagonia chilena, donde se encuentra la mayor parte de la masa ovina nacional, se evitan las gestaciones melliceras debido a que estas se asocian a alta mortalidad de recién nacidos y lento crecimiento posnatal, como resultado del bajo peso al nacimiento de los corderos. El bajo peso al nacer es consecuencia de una restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), condición donde el feto no alcanza su potencial genético de crecimiento y sus principales causas son la subnutrición materna, la insuficiencia placentaria o la combinación de ambas. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de la subnutrición materna y la gestación de mellizos sobre características corporales en los fetos ovinos bajo el manejo productivo habitual de la Patagonia. Para esto, ovejas de gestación única (n=16) y mellicera (n=16) fueron alimentadas con pradera natural (~70% de los requerimientos) o pradera natural más suplementación (~100% de los requerimientos). A los 140 días de gestación fueron sometidas a eutanasia materna y fetal, tras lo cual los fetos y sus órganos (músculo semitendinoso, corazón, pulmones, glándula adrenal, hígado, riñones, bazo, intestinos y cerebro) fueron pesados. Adicionalmente se evaluó el peso placentario. Los resultados se compararon mediante análisis de varianza, donde los factores fijos fueron el número de fetos en gestación (único o mellizos) y el plano nutricional (~70 ó ~100% de los requerimientos establecidos por el National Research Council, NRC), seguido del test post-hoc de Duncan para detección de diferencias entre grupos. Se consideraron diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$. Tanto la subnutrición materna como la gestación mellicera generaron un menor peso corporal fetal a término y un menor peso absoluto de la mayoría de los órganos fetales evaluados. Sin embargo, no generaron un efecto significativo en sus pesos relativos respecto del peso corporal, con excepción de cerebro e hígado, evidenciando el desarrollo de una RCIU asimétrica, la que fue de mayor magnitud en la condición de mellicera en comparación con la subnutrición. Estos resultados confirman la importancia de la nutrición materna en el crecimiento intrauterino del feto, en especial cuando se gestan mellizos, abriendo nuevas oportunidades para intervenciones nutricionales en este grupo, posibilitando aumentar el tamaño de la camada controlando la sobrevivencia neonatal y mejorar de esta manera la eficiencia de producción en los sistemas ovinos patagónicos.

Palabras Clave: gestación mellicera, subnutrición, restricción del crecimiento intrauterino, ovinos.

2. ABSTRACT

Twin gestations is a good strategy to increase productivity and profitability in the sheep industry. However, in Chilean Patagonia, where most of the national sheep stock is found, twin pregnancies are avoided because they are associated with high mortality of newborns and slow postnatal growth, as a result of low weight at birth. Lamb's low birth weight results from intrauterine growth restriction (IUGR), a condition in which the fetus does not reach its genetic growth potential. The main causes of IUGR are maternal undernutrition, placental insufficiency or a combination of both. The aim of the current study was to assess the effects of the maternal undernourishment and the twin gestation on body characteristics in near-term fetuses from sheep pregnancies developed under the usual productive management of Chilean Patagonia. For this, single- (n = 16) and twin-bearing (n = 16) ewes were fed with natural pasture (~70% of requirements) or natural pasture plus supplementation (~100% of requirements). At 140 days of gestation they were subjected to maternal and fetal euthanasia, after which the fetuses and their organs (semitendinosus muscle, heart, adrenal gland, lungs, liver, kidneys, spleen, intestines and brain) were weighed. Additionally, the placental weight was evaluated. The results were compared by analysis of variance, where the fixed effects were the gestation rank (single or twin) and the nutritional level (~ 70 or ~ 100% of the requirements established by the National Research Council, NRC), followed by the Duncan post-hoc test for the detection of differences between groups. Significant differences were considered when $p \leq 0.05$. Both the maternal undernourishment and the twin pregnancy allowed to a lower fetal body weight at term and to a lower absolute weight in most of the fetal organs. However, they did not show a significant effect on the organ/body weight rate, except in the cases of brain and liver, evidencing the development of an asymmetric IUGR, which was of greater magnitude by effect of twin pregnancy in comparison with maternal undernourishment. These results confirm the importance of maternal nutrition in the intrauterine fetal growth, mainly in twin-bearing ewes, opening new opportunities for nutritional interventions in this group, making it possible to increase the litter size, controlling neonatal survival and thus improving the production efficiency in the Patagonian sheep systems.

Keywords: twin pregnancy, undernutrition, intrauterine growth restriction, sheep.

3. INTRODUCCIÓN

La producción ovina es una de las principales actividades económicas para la región de Magallanes y la Antártica Chilena. Esta actividad tiene toda una tradición en el rubro y forma parte de su identidad y patrimonio.

Los sistemas productivos predominantes son los de lana y carne de tipo extensivo y una manera de mejorar la rentabilidad de forma sostenible, es aumentar la prolificidad, lo que no suele explotarse plenamente dada las características del territorio donde se desarrolla, caracterizado por su pradera natural de muy bajo valor nutritivo, con un corto periodo de crecimiento activo. Esto implica que, durante periodos nutricionales críticos como la gestación, las ovejas no alcanzan a cubrir sus requerimientos, menos aún si se trata de preñeces dobles, en donde estos son mayores, dando paso a lo denominado restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) (Gootwine *et al.*, 2007).

La RCIU es una condición donde el feto no expresa su potencialidad de crecimiento y se presenta en mayor medida cuando la placenta cobra mayor protagonismo, es decir, en el último tercio de gestación, momento donde el feto alcanza 80-85% del peso al nacimiento, por lo que su presentación, tanto en preñeces dobles y/o en situación de subnutrición en gestación tardía es altamente frecuente (Sepúlveda *et al.*, 2014).

El resultado de una RCIU es el nacimiento de corderos menos vigorosos, con menor capacidad de realizar comportamientos complejos, más pequeños y livianos producto de un alterado desarrollo de órganos y tejidos, condiciones que aumentan la morbilidad y mortalidad perinatal, en comparación con sus homólogos de gestación simple (Hatcher *et al.*, 2014). Esto reduce la expresión de rasgos económicamente importantes en la vida adulta de los corderos, como es la masa muscular, lo que implica que la canal y los cortes primarios sean más livianos. Otro aspecto importante, es la alteración de la ontogenia del crecimiento y desarrollo de los órganos viscerales. Todas estas perturbaciones en el desarrollo visceral del feto pueden tener implicaciones significativas en crecimiento posnatal y salud de los adultos (Gao *et al.*, 2009).

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Características generales de la producción ovina en la región de Magallanes

La producción ovina ha sido el principal rubro productivo en la región de Magallanes y la Antártica Chilena, el cual ha contribuido fuertemente al desarrollo local (SUBDERE, 2012). En esta región se concentra más de la mitad de los ovinos del país con 2.205.270 cabezas, según el último Censo Agropecuario (INE, 2007).

El sistema de producción ovina predominante es de lana y carne de tipo extensivo, predominado más recientemente el interés por la producción de carne (Lira, 2012).

La producción ovina se desarrolla sobre pradera natural, que en la estepa patagónica es de muy bajo valor nutritivo (Lira, 2012), dominada por los coironales de *Festuca gracillima* y Mata Verde (*Chilliostrichum diffusum*), especie endémica de los suelos salobres (Luebert y Pliscoff, 2006).

La mayoría de los productores manejan una escasa suplementación alimenticia de los rebaños en los períodos nutricionales críticos, por ello es fundamental sincronizar el ciclo productivo anual de la oveja con las variables disponibilidad y calidad de forraje (Hervé, 2013), especialmente durante la gestación, donde una oveja que gesta un cordero aumenta un 150% sus requerimientos sobre mantención, mientras que una mellicera lo hace en un 200% (Osgerby *et al.*, 2002).

4.2 Importancia de tener dos crías por parto

La eficiencia de producción puede ser definida como el número y el peso de corderos destetados por oveja encastada (Schoenian y Burfening, 1990). Un parto mellicero tiene mayor productividad que uno simple, debido a un mayor peso total de la camada al nacimiento y al destete, pero individualmente por cada cría se obtiene un menor peso corporal (García *et al.*, 2017), lo que afecta negativamente la tasa de sobrevivencia de las crías, siendo un riesgo para el éxito económico de la empresa ovina (Pérez, 2010). Por ello, el aumento del tamaño de la camada, mejorando la sobrevivencia neonatal, se convierte en un desafío para aumentar la eficiencia y la rentabilidad del rubro (Gootwine *et al.*, 2007).

4.3 Incidencia de la gestación mellicera y la subnutrición materna sobre el peso y tamaño fetal del cordero

La función placentaria es la principal responsable del crecimiento y desarrollo del feto, especialmente en el último tercio de gestación. La porción placentaria materna se denomina carúncula y la fetal cotiledón, constituyendo entre ambas las unidades placentarias denominadas placentomas. El intercambio de nutrientes es dependiente del número, el tamaño (Dwyer *et al.*, 2005) y la superficie vascular de los placentomas (Sales *et al.*, 2016), por lo que una insuficiencia placentaria, producto de un desarrollo placentario anormal afecta la transferencia de nutrientes y oxígeno al feto, por lo tanto, su adecuado crecimiento (Gonzales-Bulnes *et al.*, 2016). El crecimiento y desarrollo fetal, además se ve afectado directamente por la menor disponibilidad de nutrientes en la circulación materna, en estados de subnutrición (Gootwine *et al.*, 2007).

Todo lo anterior genera la denominada RCIU, condición por la cual un feto no expresa su potencialidad genética de crecimiento (Sepúlveda *et al.*, 2014), lo que conduce a la reducción del peso al nacimiento de los corderos (Gootwine *et al.*, 2007) y se puede presentar de forma “simétrica” o “asimétrica”. La RCIU simétrica es una reducción uniforme del feto y sus órganos, asociada a factores genéticos e infecciosos, mientras que la RCIU asimétrica es la reducción del tamaño de algunos órganos, conservando el tamaño normal de otros (Gonzales-Bulnes *et al.*, 2016). Esta condición es frecuente en preñeces dobles, en donde se genera competencia de los fetos por limitados nutrientes y oxígeno, y su impacto es aún mayor en condición de subnutrición materna (Gootwine *et al.*, 2007).

Si bien en una gestación doble el número de placentomas por feto disminuye, al aumentar el tamaño de la camada, existe un aumento en el tamaño promedio de los placentomas, seguido de un aumento en la vascularidad de estos. Sin embargo, la placenta de un mellizo no alcanza la masa placentaria total que alcanza la de un feto único (Dwyer *et al.*, 2005). Según Gootwine *et al.* (2007), el número de placentomas por feto disminuye de 70 en gestación única a 40 en mellizos y la tasa de crecimiento fetal durante la última parte de la gestación se estima en 101 g/día para mellizos *versus* 199 g/día para únicos.

4.4 Efecto peso y tamaño en la sobrevivencia y crecimiento posnatal del cordero

Una RCIU conduce a una reducción del peso al nacimiento (Sepúlveda *et al.*, 2014) que es la variable de mayor importancia en la probabilidad de sobrevivencia del cordero. Entre más

pequeño es el cordero recién nacido, mayor superficie relativa tiene, perdiendo con mayor rapidez el calor corporal, imprescindible en el postparto inmediato, sumado a que sus concentraciones de hormonas tiroideas y reservas de grasa corporal son menores, llevando a que la cría tenga una reducida vitalidad (Hatcher *et al.*, 2014) y vea limitado su comportamiento, induciendo demora en el acceso de la ubre y posterior amamantamiento, siendo más susceptibles a las inclemencias climáticas y al ataque de depredadores (Bentancor, 2013; Hatcher *et al.*, 2014).

Muchas veces el desarrollo de patologías en la vida adulta tiene origen en la vida fetal (Cleal *et al.*, 2007). Así una restricción nutricional en la gestación tardía, genera una reprogramación permanente en el patrón de desarrollo de tejidos y sistemas de órganos. Dentro de ello, se ha reportado efectos como la disminución del peso del hígado como también la disminución del número de receptores de la hormona de crecimiento (GH), que conducen al retardo del crecimiento del feto. Además, se han reportado efectos sobre el desarrollo fetal del bazo, comprometiendo la inmunocompetencia de la cría (Gao *et al.*, 2009). Otras consecuencias documentadas son alteraciones estructurales permanentes en pulmones, efecto sobre el sistema cardiovascular fetal, retraso en el desarrollo fetal del sistema gastrointestinal y ovárico. Estos cambios alteran el crecimiento postnatal y originan una serie de enfermedades en la vida posterior como cardiopatía coronaria, hipertensión, resistencia a la insulina y diabetes (Gao *et al.*, 2009).

4.5 Biometría fetal en gestación doble y subnutrición materna

La subnutrición materna afecta el crecimiento del feto en general, con diferente impacto entre los diferentes tejidos y órganos (Cleal *et al.*, 2007). El peso muscular fetal se reduce, ya sea por efectos de la gestación de mellizos, o bien por la subnutrición materna, tanto en gestaciones únicas o melliceras (Sales *et al.*, 2013). La reducción de masa muscular observada en fetos mellizos en gestación tardía es el resultado de una reducida hipertrofia muscular y no del número de fibras musculares (Sales *et al.*, 2016).

En fetos mellizos a término, el peso y la concentración de aminoácidos en el músculo semitendinoso es menor que el de los provenientes de gestación única (McCoard *et al.*, 2000, Sales *et al.*, 2013). Una situación similar se presenta en el *Longissimus dorsi* de corderos de gestaciones múltiples, lo que se mantiene en la etapa posnatal, explicando por qué a los 56

días de vida, el *Longissimus dorsi* de corderos de nacimiento múltiple es un 17,4% más liviano que en el nacimiento único (García *et al.*, 2017).

En un estudio realizado por García *et al.* (2017), los cortes primarios (pierna, cuello, brazo, tórax y abdomen) de los corderos de nacimiento múltiple, representaron entre el 80,4 y 86,7% del peso de los nacimientos únicos, lo cual coincide con MacCoard *et al.* (2010), quienes estudiaron corderos sacrificados a los 73 y 110 días. En corderos de carne (sacrificados en promedio a los 142 días), el peso de la canal en los de nacimiento mellizo representa el 90% del de nacimiento único (McCoard *et al.*, 2010). El retardo en el desarrollo muscular postnatal se explica, en parte, por el menor peso de la masa muscular al nacimiento, una desventaja inicial en la composición de la masa muscular (McCoard *et al.* 2000, Sales *et al.* 2013) y por el nivel de producción láctea de las ovejas que amamantan dos crías, que, si bien es mayor, se debe compartir y esto limita el consumo individual de nutrientes (García *et al.*, 2017).

La subnutrición materna en la gestación tardía también tiene un efecto negativo sobre la hiperplasia e hipertrofia de los órganos viscerales. Como consecuencia, los principales sistemas orgánicos presentan menor crecimiento y desarrollo, alterando la proporción de algunos órganos en relación al peso corporal (Gao *et al.*, 2009). Esta tiene consecuencias negativas de mayor magnitud a medida que la subnutrición se vuelve más severa (Gootwine, 2014).

Al comparar órganos viscerales de corderos sacrificados inmediatamente después del parto, provenientes de madres subnutridas, con corderos de madres sin restricción nutricional, se observa una disminución significativa en la relación proteína:ADN para hígado y pulmón, y también en el contenido de ADN en riñón, abomaso, yeyuno, pulmón y bazo. Estos órganos presentan un peso absoluto marcadamente inferior, a excepción del bazo, que además presenta un menor peso como porcentaje del peso corporal (Gao *et al.*, 2009). Un resultado distinto se obtiene para el crecimiento cerebral, que en ambas condiciones de subnutrición, se ve menos afectado que otros órganos (Gootwine, 2014), debido a que el cerebro es un órgano de maduración temprana por lo que tiene alta prioridad para uso de los nutrientes disponibles en el torrente sanguíneo y es menos afectado ante la subnutrición materna que los de maduración tardía (Gao *et al.*, 2009).

5. HIPÓTESIS

La subnutrición materna reduce la expresión del potencial de crecimiento intrauterino, siendo esta reducción, mayor en gestaciones de mellizos que en crías únicas.

6. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos de la subnutrición y de la gestación de mellizos sobre características corporales en los fetos de ovejas, bajo manejo habitual de la región de Magallanes y la Antártica Chilena.

6.1 Objetivos específicos

1. Cuantificar el efecto de la subnutrición y de la gestación mellicera sobre el peso fetal.
2. Cuantificar el efecto de la subnutrición y de la gestación mellicera sobre el peso de los órganos fetales.
3. Analizar el efecto de la subnutrición y de la gestación mellicera sobre la relación peso órgano/peso corporal fetal.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

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

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

Los animales considerados para este estudio fueron hembras ovinas de la raza Corriedale, de entre cuatro a seis años de edad. Durante la temporada reproductiva normal se seleccionaron desde el rebaño comercial un grupo de 32 ovejas con peso y condición corporal similares (2,5-3 en la escala 1-5). Su alimentación fue a pastoreo. Las pasturas empleadas fueron las clásicas de la región, constituidas por mata-coirón y se caracterizan por tener en promedio un 4-6% de proteína cruda (PC) y 2,1 Mcal de energía metabolizable (EM) por kilogramo de materia seca (Lira, 2012), lo que es semejante a lo descrito previamente por Wernli *et al.*

(1977). Se calcula que, por lo tanto, la pradera natural aporta solo un 70% de los requerimientos nutricionales demandados en la gestación ovina.

En la mitad de la temporada reproductiva, se indujo la sincronización estral y superovulación, mediante la administración de una dosis intramuscular de un análogo de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) (125 µg cloprostenol, Estrumate®: ICI, Macclesfield, U.K.), para primero inducir la luteólisis de los posibles cuerpos lúteos presentes en ese momento, seguido por la instalación de un dispositivo intravaginal con 0,3 g de progesterona (Eazi-breed™ CIDR® G, Pfizer Animal Health; New Zealand), el cual se mantuvo durante 11 días, para simular el período diestral. Luego de la remoción del dispositivo con progesterona (Día 0), cada oveja recibió una inyección intramuscular con 400 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG) (Novormon 5000, Syntex, Argentina) (Saevre *et al.*, 2010) para inducir la ovulación múltiple. Las hembras ovinas se encastaron mediante monta natural, utilizando cuatro carneros de fertilidad probada de la raza Corriedale, a los que diariamente se les pintó el pecho con una mezcla de aceite y tierra de color, para marcar a las hembras montadas. El período de encaste fue de cuatro días y el color de la pintura se cambió diariamente para identificar correctamente el día de la monta y posible día de inicio de la gestación.

Treinta días después de las montas, los animales fueron ecografiados para evaluar su tipo de gestación (individual o múltiple) y registrar el número de conceptos presentes.

Según el número de embriones contenidos en el útero, las hembras gestantes fueron distribuidas en dos grupos (único = U y mellizo = M). A su vez, la mitad de las ovejas de cada tipo de gestación fueron alimentadas solo con pradera natural durante toda la gestación. La otra mitad se mantuvo en las mismas condiciones, pero se suplementaron con concentrado comercial (Cosetán Tradicional; Proteína total 17%; Extracto Etéreo 1,7%; FDN 34%; FDA 23% base seca), calculado según el peso de los animales y la etapa de la gestación para satisfacer alrededor del 100% de sus requerimientos establecidos por el *National Research Council* para ovejas gestantes (NRC, 1985). De esta forma, se constituyeron cuatro grupos experimentales: ovejas de gestación única, alimentadas sólo en base a pradera natural (grupo RU); ovejas de gestación única, alimentadas en base a pradera natural, más suplemento (grupo CU); ovejas de gestación mellicera, alimentadas solo en base a pradera natural (grupo RM); ovejas de gestación mellicera, alimentadas en base a pradera natural, más suplemento (grupo CM).

Se evaluó el peso y la condición corporal de las ovejas cada 30 días, para ajustar a suplementación de concentrado. El número de animales por grupo se estimó sobre la base de la variabilidad del peso corporal al nacimiento y considerando un poder estadístico del 95% y $\alpha=0,05$ (Freitas de Melo *et al.*, 2015).

Al día 140 de gestación, las ovejas fueron sometidas a eutanasia materna y fetal con una sobredosis endovenosa de tiopental. Tras la eutanasia fetal, éstos fueron exteriorizados, secados, medidos, sexados y pesados. Adicionalmente, se pesaron por separado los siguientes órganos y tejidos fetales: músculo semitendinoso, corazón, pulmones, glándula adrenal, hígado, riñones, bazo, intestinos, cerebro.

Adicionalmente se pesaron las placentas, información que sumada a la medición de la condición corporal y peso de las ovejas permitió la evaluación de la subnutrición materna.

7.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos para las variables estudiadas (medidas fetales al nacimiento y pesos de órganos y tejidos) fueron analizados para verificar si se ajustan a una distribución normal, mediante la prueba de Shapiro Wilk. Luego estos datos se compararon mediante análisis de varianza, utilizando el software estadístico SPSS. Las comparaciones a realizar incluyeron dos factores cruzados: el tipo de gestación según el número de conceptos (individual y mellizos) y el nivel nutricional (solo pradera o pradera más suplementación), así como la interacción entre estos factores. Se realizaron análisis estadísticos de los pesos de los órganos en forma directa, así como también de la relación y peso cerebro/peso hígado, como forma de establecer RCIU (Cox y Marton, 2009). Se consideró una probabilidad de $P \leq 0,05$ para establecer diferencias estadísticamente significativas. Los resultados son expresados como medias \pm error estándar de la media.

8. RESULTADOS

Los resultados generales del presente estudio muestran que el número de fetos y el nivel nutricional ejercen efectos sobre las características corporales en ovejas preñadas y sus fetos, específicamente la condición de mellicera de las ovejas, la subnutrición materna y la interacción entre ambos factores tiende a afectar negativamente el peso fetal, de los órganos fetales y la relación de algunos órganos con el peso corporal fetal.

En la Figura N° 1 se presenta el peso y la condición corporal de las ovejas que fueron consideradas en este estudio, entre el día 44 y 140 de la gestación. En la Figura N° 1 A se muestra el peso de las ovejas, donde en el primer periodo gestacional hubo un incremento en el peso de todas las ovejas, lo cual se prolongó en el tiempo solo en los grupos de madres suplementadas, mientras que en las ovejas subnutridas no hubo cambios en el peso hasta el final de la gestación, resultando al día 140 significativamente más livianas que las ovejas suplementadas. En la Figura N° 1B se presenta la condición corporal de las ovejas, la cual en ovejas suplementadas aumenta en el primer periodo gestacional, mientras que disminuye levemente en las ovejas subnutridas. En los siguientes puntos muestrales la condición corporal de estas últimas siguió disminuyendo levemente, contrario a las ovejas suplementadas que luego del incremento inicial no presentaron variación (día 77 en adelante), resultando significativamente mayores.

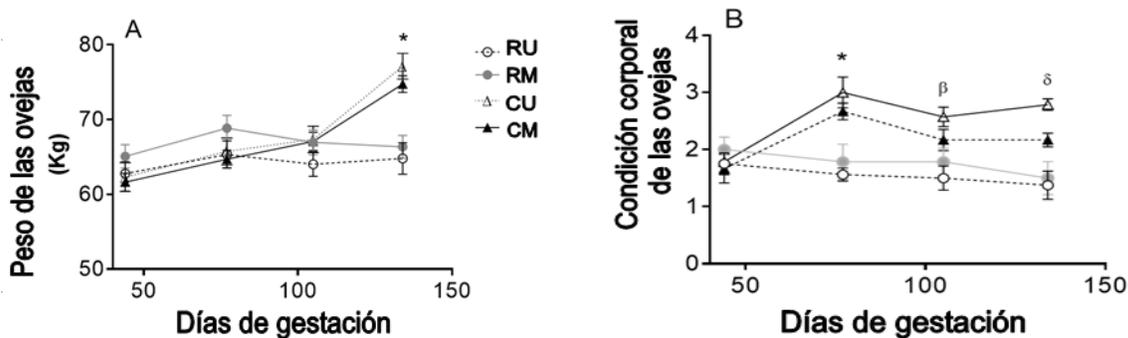


Figura N°1: peso (A) y condición corporal (B) de las ovejas a lo largo de la gestación. Asterisco (*) indica diferencia significativa entre grupos alimentados con pradera natural y pradera natural más suplementación en el mismo tiempo muestral. β indica diferencia significativa entre grupos alimentados con pradera natural y pradera natural más suplementación en el mismo tiempo muestral, pero RM y CM son iguales. Δ indica diferencia significativa entre grupos alimentados con pradera natural y pradera natural más suplementación en el mismo tiempo muestral y CU también presenta diferencia con CM ($p \leq 0,05$).

8.1 Efecto de la gestación mellicera y la subnutrición materna sobre el peso fetal

Se analizó el efecto del número de fetos y el nivel nutricional de la madre sobre el peso fetal a los 140 d de gestación. Los resultados (Figura N° 2) muestran que la gestación de mellizos ejerce un efecto negativo en el peso fetal, disminuyéndolo de manera significativa ($p < 0,001$). En cuanto a la nutrición, los fetos de las madres alimentadas únicamente con pradera natural (subnutridas) obtuvieron un peso significativamente menor en relación con los suplementados ($p = 0,025$). Sin embargo, la interacción entre el número de fetos y la nutrición no fue significativa (NS).

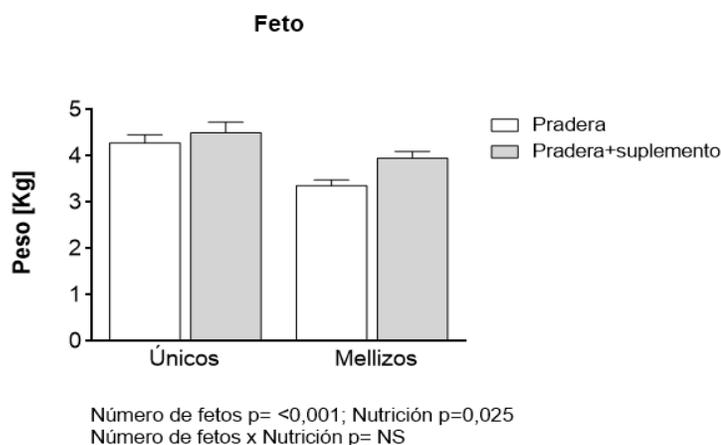


Figura N°2: Peso fetal en gestación única y de mellizos provenientes de madres alimentadas con pradera natural y pradera natural más suplementación.

8.2 Efecto de la gestación mellicera y la subnutrición materna sobre el peso de órganos fetales.

Se analizó el efecto del número de fetos y el nivel nutricional de la madre sobre el peso de órganos fetales a los 140 d de gestación. Estos resultados se detallan a continuación según su ubicación cráneo-caudal.

La Figura N°3 muestra que ninguna de las dos variables estudiadas generó un efecto estadísticamente significativo sobre el peso cerebral ($p>0,05$), a diferencia del pulmón (Figura N° 4), donde se observa que tanto el número de fetos como el nivel nutricional generan efectos sobre el peso de este órgano ($p<0,01$ y $p=0,03$, respectivamente), siendo menor en fetos de gestación mellicera y en los que provienen de madres subnutridas. Por el contrario, este no se ve afectado de forma significativa ($p>0,05$) por la interacción entre el número de fetos y la nutrición. De igual forma existe efecto del número de fetos sobre el peso del corazón fetal (Figura N° 5), donde en fetos de gestación mellicera, este órgano fue significativamente más liviano ($p<0,01$), mientras que el nivel nutricional y su interacción con el número de fetos no genera efecto estadísticamente significativo ($p=0,5$ y $p>0,05$ respectivamente).

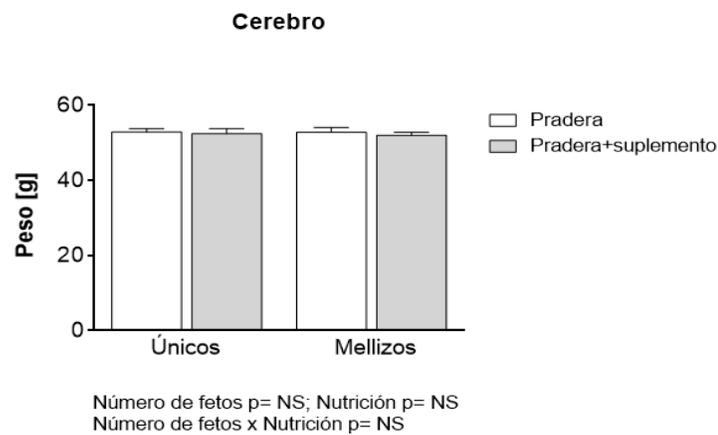


Figura N°3: Peso del cerebro de fetos únicos y mellizos provenientes de madres alimentadas con pradera natural y pradera natural más suplementación.

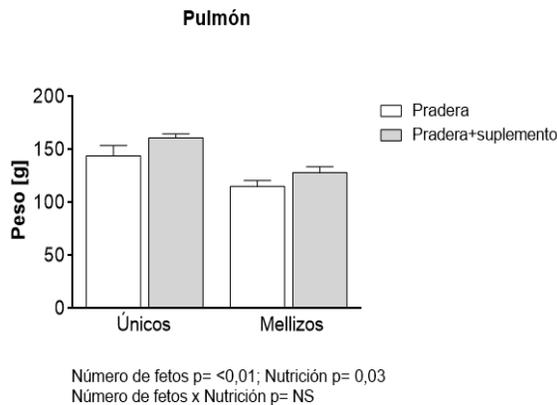


Figura N°4: Peso del pulmón de fetos únicos y mellizos provenientes de madres alimentadas con pradera natural y pradera natural más suplementación.

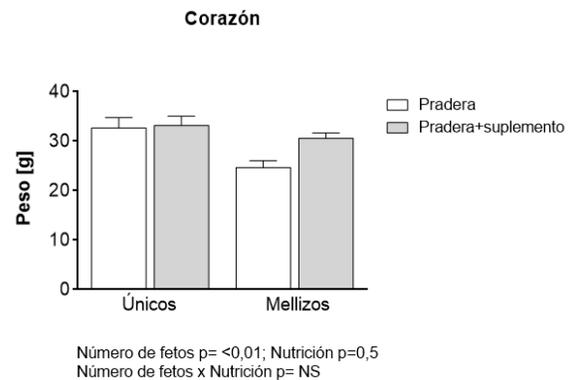


Figura N°5: Peso del corazón de fetos únicos y mellizos provenientes de madres alimentadas con pradera natural y pradera natural más suplementación.

Dentro de los órganos del sistema gastrointestinal, el peso del hígado (Figura N°6) fue significativamente menor, tanto por el efecto de la gestación mellicera como por la subnutrición materna ($p < 0,01$ y $p = 0,05$, respectivamente), sin afectarse por la interacción entre ambos factores ($p > 0,05$). Mientras que el intestino (Figura N°7) es uno de los dos órganos de este estudio que no vio afectado su peso de forma significativa por ninguna de las tres variables.

Respecto al bazo y la glándula adrenal (Figura N° 8 y 9), se observa que en ambos, el peso es significativamente menor en gestación de mellizos ($p < 0,01$), mientras que la subnutrición de las madres únicamente generó un peso significativamente menor en glándula adrenal ($p = 0,01$), no así en bazo. La interacción entre el número de fetos y la nutrición no evidencia un efecto significativo ($p > 0,05$) sobre el peso de ambos órganos.

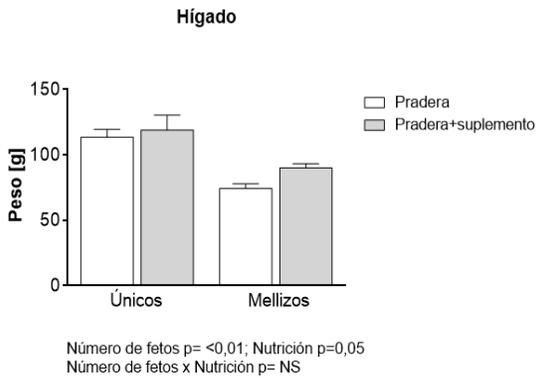


Figura N°6: Peso del hígado de fetos únicos y mellizos provenientes de madres alimentadas con pradera natural y pradera natural más suplementación.

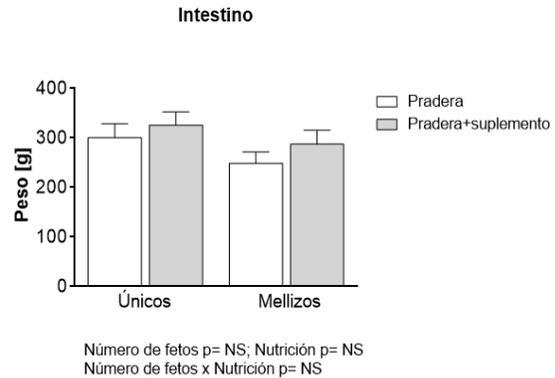


Figura N°7: Peso del intestino de fetos únicos y mellizos provenientes de madres alimentadas con pradera natural y pradera natural más suplementación.

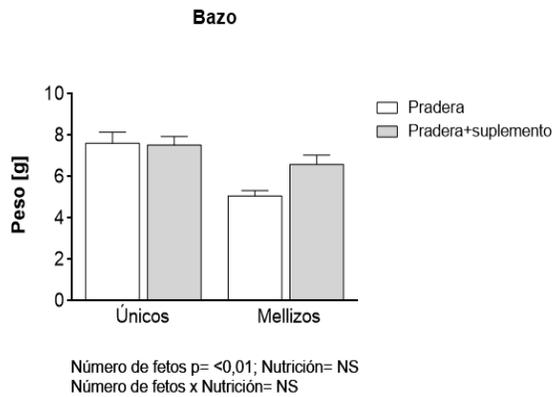


Figura N°8: Peso del bazo de fetos únicos y mellizos provenientes de madres alimentadas con pradera natural y pradera natural más suplementación.

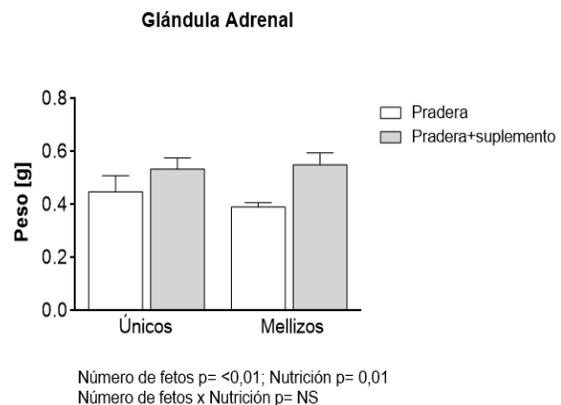


Figura N°9: Peso de la glándula adrenal de fetos únicos y mellizos provenientes de madres alimentadas con pradera natural y pradera natural más suplementación.

Como muestra la Figura N° 10 y 11, la gestación de mellizos se asoció con una disminución del peso, tanto de riñón derecho como del izquierdo, en relación con los de gestación única ($p < 0,01$), mientras que el nivel nutricional de las madres no generó efecto significativo en ninguno de los dos órganos (NS). En cuanto a la interacción entre el número de fetos y la nutrición, esta estuvo presente sólo en riñón izquierdo ($p < 0,05$). En esta interacción, se observa que la suplementación no generó respuesta en el grupo único, mientras que sí lo hizo

dentro del grupo de gestación mellicera, donde el peso de este órgano se igualó al peso renal del grupo único bajo sus dos planos nutricionales.

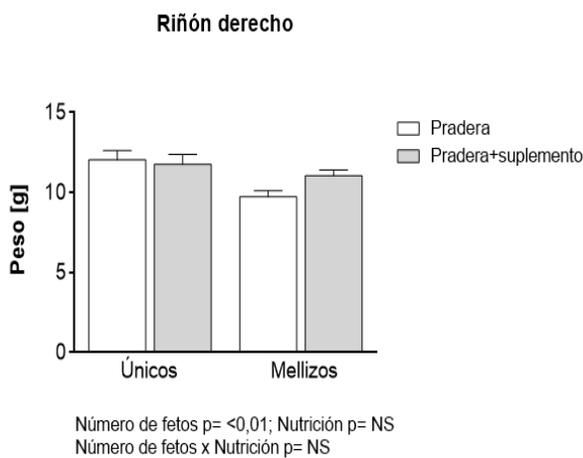


Figura N°10: Peso del riñón derecho de fetos únicos y mellizos provenientes de madres alimentadas con pradera natural y pradera natural más suplementación.

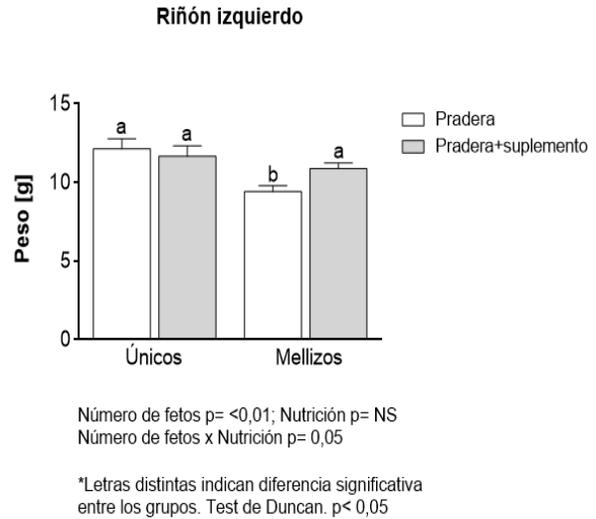


Figura N°11: Peso del riñón izquierdo de fetos únicos y mellizos provenientes de madres alimentadas con pradera natural y pradera natural más suplementación.

En cuanto al peso de la placenta, este se ha medido por oveja y por feto (Figura N°12 y 13), en ambos casos los resultados señalan que el número de fetos tiene un efecto significativo. El peso placentario por oveja, en gestaciones de mellizos aumentó, mientras que el peso placentario por feto disminuyó ($p < 0,01$). El efecto del nivel nutricional sólo alcanzó el nivel de significancia cuando fue evaluado por oveja, el que disminuye en animales no suplementados ($p = 0,025$). No se observó interacción entre el peso de la placenta con el número de fetos o con el nivel nutricional ($p > 0,05$).

Para el músculo semitendinoso (Figura N°14), se observó un efecto significativo de la gestación mellicera, dando origen a un órgano más liviano que su contraparte único ($p < 0,01$), mientras que el nivel nutricional y la interacción del peso del músculo con el número de fetos no presentaron efectos significativos ($p > 0,05$).

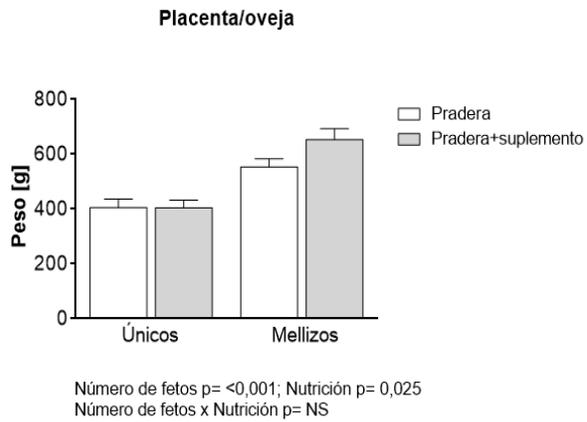


Figura N°12: Peso de la placenta por oveja de fetos únicos y mellizos provenientes de madres alimentadas con pradera natural y pradera natural más suplementación.

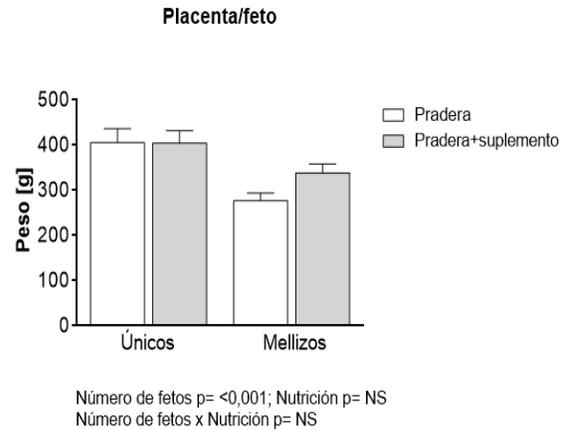


Figura N°13: Peso de la placenta por feto de fetos únicos y mellizos provenientes de madres alimentadas con pradera natural y pradera natural más suplementación.

Finalmente en la relación cerebro/hígado (Figura N°15), el número de fetos no mostró efecto significativo sobre esta relación ($p < 0,1$), contrario al efecto del nivel nutricional, donde en fetos de madres subnutridas la relación aumenta significativamente comparada con la de madres suplementadas nutricionalmente ($p = 0,02$). En cuanto a la interacción de los dos tratamientos, está resultó significativa ($p < 0,05$) y se observa que la relación fue mayor en los grupos de gestación mellicera al compararla con la de gestación única. Además, el grupo mellizos de madres subnutridas presentó una mayor relación que el grupo mellizos de madres suplementadas ($p \leq 0,05$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos de gestación única para ambos planos nutricionales.

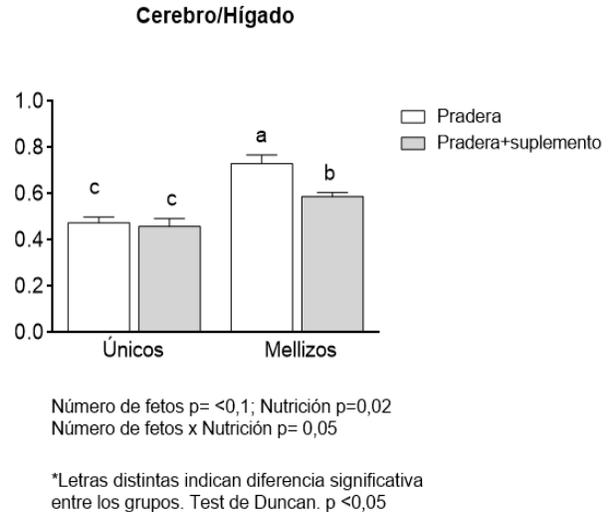
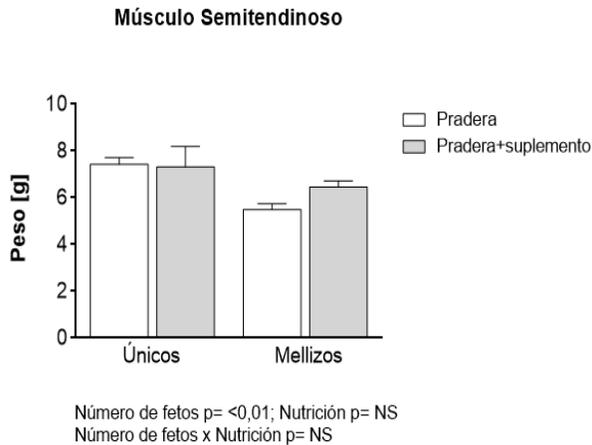


Figura N°14: Peso del músculo semitendinoso de fetos únicos y mellizos provenientes de madres alimentadas con pradera natural y pradera natural más suplementación.

Figura N°15: Relación cerebro/hígado de fetos únicos y mellizos provenientes de madres alimentadas con pradera natural y pradera natural más suplementación.

8.3 Efecto de la gestación mellicera y la subnutrición materna sobre la relación peso órgano/peso corporal fetal

Como se muestra en la Tabla N°1, los pesos de los órganos expresados como fracción del peso corporal fueron similares dentro de los grupos, es decir el peso de los órganos fue menor conforme disminuyó el peso fetal frente a los dos tratamientos, ya que no hubieron diferencias significativas, con excepción del peso cerebral, que en fetos de gestación mellicera fue mayor ($p < 0,001$) que en gestación única, así como también lo fue en los grupos de fetos de madres subnutridas ($p = 0,011$). Por otro lado, el tipo de gestación también tuvo efecto sobre el peso del hígado fetal (%), el cual fue significativamente mayor en los fetos de gestación única ($p < 0,001$).

Tabla N°1: Efecto de la gestación mellicera y la subnutrición materna sobre peso de órganos fetales expresados como fracción del peso corporal.

Peso órgano/peso fetal (x100)	Único pradera	Único Prad+Supl.	Mellizos pradera	Mellizos Prad+Supl.	Número de fetos (R)	Nivel nutricional (N)	RxN
Cerebro	1,25 ± 0,05	1,17 ± 0,04	1,59 ± 0,06	1,34 ± 0,04	<0,001	0,01	0,14
Corazón	0,76 ± 0,04	0,74 ± 0,03	0,73 ± 0,02	0,77 ± 0,02	0,89	0,74	0,28
Pulmón	3,38 ± 0,24	3,62 ± 0,17	3,41 ± 0,09	3,02 ± 0,20	0,18	0,71	0,14
Hígado	2,65 ± 0,09	2,62 ± 0,15	2,20 ± 0,04	2,29 ± 0,06	<0,001	0,68	0,46
Bazo	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,15	0,69	298
Intestino	6,94 ± 0,43	7,20 ± 0,36	7,28 ± 0,48	7,07 ± 0,48	0,85	0,96	664
Gland. adrenal	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,09	0,06	0,69
Riñón Derecho	0,28 ± 0,01	0,26 ± 0,00	0,29 ± 0,00	0,28 ± 0,00	0,15	0,13	0,54
Riñón Izquierdo	0,28 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,28 ± 0,00	0,27 ± 0,00	0,50	0,15	0,22
Musc. Semitendinoso	0,17 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,64	0,39	0,33
Placenta por oveja	9,41 ± 0,46	8,98 ± 0,45	16,46±0,78	16,06±0,88	<0,001	0,82	0,97
Placenta por feto	9,41 ± 0,46	8,98 ± 0,45	8,23 ± 0,37	8,57 ± 0,62	<0,001	0,77	759

9. DISCUSIÓN

9.1 Efecto de la subnutrición materna y tipo de gestación sobre peso y condición corporal materna.

Las condiciones de pastoreo utilizadas tradicionalmente en la Patagonia tienen un impacto negativo en el peso vivo y la condición corporal (CC) de las ovejas gestantes a término, con una serie de implicancias en el peso y desarrollo de las crías (Lira, 2012).

Los resultados del presente estudio indican que en los grupos suplementados (~100% de los requerimientos) la CC aumentó hasta el día 77 de gestación y disminuyó de manera leve en los grupos subnutridos (~70% de los requerimientos). Esto se explica, en parte, porque las ovejas aumentan su ingesta de alimento en esta primera etapa (que además conduce al aumento del peso de las madres), lo cual es una estrategia adaptativa que propicia el depósito de reservas energéticas para ser utilizadas cuando sean necesarias en la gestación tardía (Newbern y Freemark, 2011) y, si bien los requerimientos nutricionales maternos aumentan debido a que en este periodo se lleva a cabo la totalidad del desarrollo placentario y la embriogénesis, estos aún no son máximos, por lo que las ovejas son capaces de suplir las demandas que exige esta etapa gestacional (Osgerby, *et al.*, 2003). En consecuencia, existe una mantención o pérdida leve de la CC en esta etapa. Luego las ovejas suplementadas con concentrado mostraron un aumento sostenido del peso vivo con el avance de la gestación, producto fundamentalmente del aumento sustancial del peso fetal, ya que es en el último tercio de gestación los fetos ganan entre el 80-85% de su peso al nacimiento (Sepulveda *et al.*, 2014), mientras que la CC se mantuvo hasta el fin de la preñez en gestación única y presentó una pequeña disminución en gestación mellicera. Los valores de CC alcanzados por estos grupos (2,5 a 3,0) al final de la gestación son considerados como adecuados para llevar a término crías con un adecuado peso al nacimiento (Cranston *et al.*, 2017). En contraste, las ovejas que no fueron suplementadas, mostraron en este último tercio una disminución del peso vivo a pesar del aumento en el peso fetal, sugiriendo una movilización sustancial de las reservas corporales maternas, dejando biodisponible una mayor cantidad de glucosa y lípidos para así “amortiguar” el déficit de los nutrientes feto-placentarios (Osgerby *et al.*, 2003), siendo consistente con la disminución de la CC de estos grupos, lo que evidencia la incapacidad de la pradera patagónica de esta zona para cubrir los requerimientos nutricionales de las ovejas en gestación.

9.2 Efecto de la subnutrición materna y tipo de gestación sobre peso placentario y peso fetal.

Está ampliamente demostrado que la subnutrición materna tiene un efecto negativo en el crecimiento fetal, con diferente impacto en tejidos y órganos (Cleal *et al.*, 2007), ya que genera un impedimento en la expresión del potencial genético de crecimiento intrauterino (RCIU). Esta condición tiene profundas implicancias para la salud y el bienestar en la vida postnatal, según lo que se conoce como “Reprogramación fetal” (Gluckman y Hanson, 2004). La RCIU provoca un desarrollo fetal deficiente y la reducción del peso al nacimiento de los corderos, asociado a altas tasas de morbilidad y mortalidad perinatal, ya que los corderos recién nacidos no poseen la madurez fisiológica para enfrentar el cambio de vida intrauterina a la extrauterina en el campo (Bentancor, 2013; Hatcher *et al.*, 2014), sobre todo en territorios con clima adverso como el de Magallanes, además altera el crecimiento postnatal, ganancia diaria de peso entre el nacimiento y destete (De Blasio *et al.*, 2007; McCoard *et al.*, 2010) y salud de los adultos, ocasionando una serie de consecuencias negativas en la productividad, que se traducen finalmente en pérdidas económicas (McCoard *et al.*, 2010).

El suministro de nutrientes fetales se puede ver comprometido por múltiples vías y sus consecuencias sobre el crecimiento fetal dependerán de la etapa gestacional donde acontezca y su magnitud (Bocca-Tjeerts *et al.*, 2014). El primer periodo crítico es el periconcepcional. Una restricción nutricional materna en este momento puede resultar en una RCIU producto de una insuficiencia placentaria (Cox y Marton, 2009). Esto porque la nutrición modifica el desarrollo placentario que acontece en el primer tercio de gestación, se forman menos placentomas por un menor anclaje entre los cotiledones fetales a las carúnculas maternas, comprometiendo el desarrollo vascular, modificando así el peso placentario por oveja (Dwyer *et al.*, 2004 y Van der Linden *et al.*, 2014) que en este estudio fue un 9,39% menor en los grupos subnutridos. Producto de este desarrollo insuficiente, la placenta es incapaz de transferir la cantidad necesaria de nutrientes y oxígeno que demanda el feto, afectando su desarrollo. Por otra parte, el último tercio de gestación se identifica como el segundo periodo crítico en el crecimiento fetal, donde las demandas nutricionales fetales son más altas, ya que en este periodo ocurre la mayor parte de la ganancia de peso fetal y las deficiencias nutricionales maternas pueden verse reflejadas en el feto con mayor notoriedad (Igwebuike, 2010).

Una alteración en el suministro de nutrientes fetales modifica el eje glucosa-insulina-IGF-I, que media de forma importante el desarrollo del feto. Por una parte, la glucosa promueve el crecimiento fetal directamente, al proporcionar energía necesaria para el crecimiento de los tejidos, mientras que la insulina y el IGF-I lo hacen de forma indirecta. La primera promoviendo la lipogénesis materna y la proliferación celular en los huesos y tejidos blandos y, la segunda, influyendo en la transferencia de glucosa y aminoácidos a través de la placenta con acción mitogénica y diferenciadora. Se reporta que entre mayor es la restricción nutricional, más baja es la concentración de estos sustratos, los cuales tienen una relación directa al peso del nacimiento de los corderos (Osgerby *et al.*, 2003). Según lo anterior era de esperar que, en nuestro estudio, la subnutrición materna causada por las condiciones naturales de la pradera patagónica, tuviera un efecto negativo en el peso fetal a término, el cual fue un 10% menor que su contraparte suplementada, resultado dado por un desarrollo placentario insuficiente al inicio de la gestación y por una menor disponibilidad de nutrientes. Sabemos que el peso al nacimiento no es únicamente responsabilidad de la nutrición de las madres, ya que en ovejas óptimamente nutridas este disminuye a medida que aumenta el tamaño de la camada (Freetly y Leymaster, 2004). Nuestros resultados indican que en gestación mellicera, el peso de los corderos al nacimiento fue un 15,8% menor que los de gestación única, lo que está dentro del rango reportado por distintos autores, que indican que los fetos mellizos nacen con un peso entre 13 a 20% menor que los únicos (Gootwine *et al.*, 2007; Hancock *et al.*, 2012; McCoard *et al.*, 2017).

Por un lado, los fetos mellizos pueden tener una mayor exposición a las adaptaciones fisiológicas, neuroendocrinas y metabólicas hechas por la madre en tiempos de nutrición subóptima. Sin embargo, reciben una mayor agresión nutricional que los fetos únicos, en virtud de una mayor proporción entre el peso feto y el de la placenta (Sepúlveda *et al.*, 2014; Van der Linden *et al.*, 2014). Por esta razón, aunque el peso placentario total en gestación mellicera fue un 32,9% mayor que en únicos, cuando se midió por feto sólo alcanzó un 23,3%, el que fue significativamente menor que su contraparte. Esto porque si bien en gestación mellicera existe un aumento del tamaño promedio de los placentomas y también una mayor vascularización de estos (Vonnahme *et al.*, 2008), el número de placentomas por feto es menor ya que cada hembra ovina nace con un número máximo de carúnculas disponibles para la formación de los placentomas, por lo que en gestación mellicera este número fijo se debe compartir y no logran alcanzar el peso placentario de una gestación única

(Dwyer *et al.*, 2005; Van der Linden *et al.*, 2014). Adicionalmente, bajo estas condiciones se altera el eje somatotrófico, el cual también modifica la función del transporte placentario de los aminoácidos esenciales y de cadena ramificada hacia el feto, que como se ha observado en humanos y animales, son sustancialmente más bajos en los mellizos con RCIU (Bajoria *et al.*, 2002; Devaskar y Chu, 2016). Estos antecedentes ayudan a explicar por qué el efecto de gestación mellicera fue más detrimental que el de la subnutrición materna sobre el peso de los fetos estudiados.

Tradicionalmente, la RCIU se asocia principalmente a una disminución de los aportes nutricionales que llegan al feto y a alteraciones placentarias, sin embargo la hipoxia fetal también puede ser el evento primario en su patogenia (Bajoria *et al.*, 2002; Soria *et al.*, 2013). Como se evidencia en estudios realizados por Parraguez *et al.* (2005; 2006) en rebaños mantenidos a grandes alturas, donde la exposición de ovejas gestantes a hipoxia crónica generó una RCIU y por tanto menores pesos al nacimiento de los corderos. No obstante, la hipoxia fetal no solo tiene origen en la altura. Existe evidencia de que gestaciones múltiples cursan con hipoxemia fetal en ausencia de otras condiciones concomitantes, lo que puede contribuir, al menos, de manera parcial al desarrollo de una RCIU (Rurak y Bessette, 2013; Sales *et al.*, 2018), situación que podría estar exacerbada en las preñeces melliceras bajo condiciones de subnutrición. Además, se describe que la hipoxia se relaciona con el incremento del estrés oxidativo, el que también afecta el crecimiento y el correcto desarrollo fetal (Morrison *et al.*, 2008; Parraguez *et al.*, 2011). Este es otro posible mecanismo que explica el menor peso fetal alcanzado por el grupo de gestación mellicera subnutridos.

9.3 Efecto de la subnutrición materna y tipo de gestación sobre peso absoluto y relativo de órganos fetales.

Los trastornos que afectan al embrión al inicio de la gestación darán como resultado la pérdida de uno o más ciclos de división celular, por esta razón cuando las deficiencias intrauterinas son más severas, es más probable que persistan en la vida adulta (Cox y Marto, 2009). Durante el desarrollo fetal, existen órganos claves que tienen prioridad en la partición de nutrientes dado por el mayor gasto cardiaco fetal, para así asegurar su desarrollo. El órgano con mayor prioridad en todo el desarrollo es el cerebro. Este, al ser un órgano de maduración temprana, asegura que ante un déficit, los nutrientes serán desviados a su metabolismo a expensas del tronco, las extremidades y las vísceras abdominales; esto es conocido como

efecto de “ahorro cerebral” (Gao *et al.*, 2014; Gootwine, 2014). Nuestros resultados reflejan de manera clara lo expuesto, ya que el peso cerebral se mantuvo sin cambios en los cuatro grupos estudiados, es decir se desarrolló de manera normal a pesar de los tratamientos. Cuando el peso cerebral fue expresado como porcentaje del peso corporal, el valor tanto de los grupos Único y Mellizo subnutridos fue mayor que su contraparte suplementada, ya que en estos grupos el peso fetal, en general fue más ligero, producto del menor peso de los órganos fetales restantes, contribuyendo al mayor valor del cerebro expresado como porcentaje del peso corporal.

Si bien el desarrollo del cerebro tiene prioridad ante el resto de los órganos fetales, existen determinados órganos que también se ven más protegidos por el gasto cardíaco fetal, como es el caso de la glándula adrenal. Lo anterior es un reflejo del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal que juega un papel central en las adaptaciones fisiológicas, que permiten al feto sobrevivir al estrés intrauterino prolongado, prepararse y dar inicio a la transición a la vida extrauterina (Phillips *et al.*, 1996). De acuerdo con esto, los resultados de este estudio no fueron los esperados, ya que la subnutrición y la gestación mellicera hicieron disminuir el peso de la glándula adrenal de manera significativa, es decir no se garantizó su desarrollo normal, difiriendo de lo reportado por Osgerby *et al.* (2002), que ante un grado de desnutrición (30% de los requerimientos) y tiempo de tratamiento similar a nuestro estudio, no registró un cambio significativo como peso absoluto. En gestaciones melliceras se ha encontrado que las adrenales fetales presentan menores niveles de la enzima limitante para la biosíntesis de IGF-I, IGFII y los receptores de IGF, que son importantes para estimular el crecimiento de la glándula suprarrenal fetal (Rumbal *et al.*, 2008), lo que permitiría explicar nuestro resultado, al menos parcialmente. Sin embargo, el efecto de nuestros tratamientos sobre el peso adrenal absoluto se corrige cuando se ponderaron con los pesos fetales, ya que la disminución del peso relativo adrenal no fue significativo ante ningún tratamiento. Bajo otros modelos experimentales de RCIU como la carunculectomía previa al encaste (Poudel *et al.*, 2015) o la embolización umbilicoplacentaria desde el día 120 de gestación (Cock *et al.*, 2001), se reporta un aumento en el peso relativo de este órgano, lo que indica su importancia dentro del desarrollo, lo que la vuelve al menos en humanos, sugerente de RCIU del tipo asimétrica (Cox y Marton, 2009).

En general, el corazón es un órgano que también se ve más protegido por el gasto cardíaco fetal, ya que el sistema cardiovascular madura más tempranamente y está relativamente

funcional en gestación tardía (Morrison, 2008). Según lo anterior, nuestros resultados indican que la deficiencia nutricional, no fue suficiente para generar órganos significativamente más livianos. Sin embargo, la gestación mellicera sí lo fue, ya que la RCIU asimétrica que se genera en este último caso es de mayor magnitud, lo cual es coherente con los resultados obtenidos por Poudel *et al.* (2015), quienes mediante una insuficiencia placentaria inducida por carunclectomía previa al encaste, la que se describe de mayor severidad, detectó que, si bien este órgano no sufrió cambios en el flujo sanguíneo, sí tuvo un menor suministro de oxígeno y glucosa, lo que indujo un retraso en la maduración de los cardiomiocitos en el feto de crecimiento restringido generando un menor peso absoluto.

En cuanto al hígado, este es el órgano que cumple con el mayor número de funciones en la vida adulta. Nuestros resultados indican que es un órgano altamente sensible a deficiencias nutricionales durante el desarrollo fetal, ya que se observó un deterioro significativo en su peso por efectos de la subnutrición y la gestación mellicera, lo que concuerda con reportes previos (Osgerby *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2014). El menor peso hepático, producto de la restricción nutricional tiene como consecuencia una disminución en el número de receptores para la hormona del crecimiento (GH), lo que participa en la regulación de la distribución de sustratos durante la adaptación del feto a la limitación nutricional (Gao *et al.*, 2009). Sin embargo, el mayor efecto fue ocasionado, una vez más, por la gestación mellicera, ya que la drástica disminución observada en el peso absoluto ocasionó además un menor peso relativo, efecto no generado por la nutrición.

Producto del efecto de ahorro cerebral y la gran sensibilidad del hígado frente a la restricción de sustratos, la literatura señala que el indicador más útil y confiable de RCIU asimétrica es la relación cerebro:hígado (Cox y Marton, 2009; Gao *et al.*, 2014). Un aumento de esta relación significa un menor peso hepático, lo que refleja la magnitud de la RCIU que acontece. De acuerdo con esto, nuestros resultados muestran que las madres alimentadas únicamente con pradera natural desarrollaron fetos con RCIU asimétrica, al igual que los fetos provenientes de gestación mellicera, especialmente en los grupos subnutridos donde esta condición fue significativamente más severa. No se ha encontrado literatura donde se establezcan los valores límites de este índice para afirmar la presencia de RCIU asimétrica en ovejas. Sin embargo, su sola variación frente al valor que establece el grupo control permite saber que está presente y pensar en medidas estratégicas sobre los grupos más afectados. En humanos no hay consenso sobre el rango normal; sin embargo, algunos

patólogos mencionan que la relación normal es 2,8:1 y cuando esta es superior a 3 sería evidencia de RCIU, aunque este valor utilizado para el diagnóstico ha demostrado una muy baja sensibilidad y especificidad (Cox y Marton, 2009).

En lo referente a pulmón, se sabe que un determinante importante del crecimiento pulmonar fetal y la maduración estructural es el grado en que los pulmones se expanden con el líquido pulmonar. Este es activamente secretado por el epitelio pulmonar y su tasa de producción se ve inhibida por la hipoxemia fetal y la acidemia (Cock *et al.*, 2001). De acuerdo con esto, era esperable que la gestación mellicera tuviese un efecto mayor sobre el peso pulmonar que la subnutrición materna, producto de la insuficiencia placentaria, a pesar de que ambos tratamientos alcanzaron significancia. Estos resultados concuerdan con múltiples estudios realizados bajo diferentes modelos de RCIU (Osgerby *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2009; Poudel *et al.*, 2015 Cock *et al.*, 2001), demostrando que en pulmón, tanto la hipoglicemia como la hipoxemia, generan un marcado efecto sobre su peso absoluto a término.

Se ha descrito que el sistema renal, al igual que el cardiovascular, están funcionalmente maduros en la gestación tardía, por lo que deficiencias agudas o de baja intensidad no ven comprometido de inmediato su desarrollo (Morrison, 2008). Sin embargo, cuando las deficiencias son crónicas o muy intensas, producto del efecto “ahorrador del cerebro”, se compromete la perfusión renal, generando distintos niveles de atrofia que se reflejan en su peso (Cock *et al.*, 2001). Lo anterior es consistente con lo observado en el presente estudio, donde la subnutrición no fue capaz de alterar el peso de ambos riñones, pero sí la gestación mellicera, al ser un efecto de mayor magnitud. En el riñón izquierdo, la interacción observada muestra que la subnutrición solo tuvo un efecto negativo sobre el peso renal en gestación mellicera, donde además la respuesta a la suplementación fue lo suficientemente positiva como para igualar el peso al grupo de gestación única.

Una situación semejante ocurrió en el bazo, el que resultó ser altamente sensible a la gestación de mellizos, pero no a la nutrición. No obstante, como en la mayoría de los órganos evaluados (con excepción del cerebro), gráficamente se puede visualizar que la subnutrición si generó una disminución en su peso, aunque el modelo de este estudio no lo refleje estadísticamente, más aún cuando se sobrepone a una gestación mellicera. La RCIU durante el desarrollo tardío del bazo podría influir en la inmunocompetencia de las crías, siendo responsable en parte de la alta morbilidad y mortalidad neonatal (Gao *et al.*, 2009).

Respecto a los resultados obtenidos para el peso de los intestinos, los datos muestran que los tratamientos estudiados no tuvieron efecto significativo, difiriendo de lo esperado, ya que se describe como un órgano altamente sensible a las deficiencias nutricionales (Gootwine, 2014; Younozai, 1971). La falta de efecto de la nutrición (al igual que en bazo, corazón y riñón derecho) pudo deberse a la adaptación protectora de la madre a la RCIU, donde las adaptaciones placentarias y la movilización de reservas nutricionales maternas serían suficiente para “amortiguar” este efecto, lo cual es insuficiente en gestaciones melliceras, donde las deficiencias son más severas. Sin embargo, gestar dos fetos tampoco fue suficiente para modificar de manera significativa el peso intestinal, por lo que podríamos atribuir estos resultados a una mayor variabilidad de esta característica y a un tamaño muestral insuficiente, ya que producto del difícil manejo de la muestra en terreno y las diferencias de humedad y contenido intestinal al momento del pesaje, el número de intestinos pesados no fue suficiente para mostrar resultados con significancia estadística.

En cuanto al peso relativo, corazón, pulmón, adrenales, bazo, riñones e intestino no presentaron variación significativa frente a sus controles, por lo que la redistribución del gasto cardiaco fetal desempeña un papel clave en el mantenimiento del crecimiento relativo e intentar mantener la función óptima de estos órganos, a pesar de ejercer efectos sobre sus pesos absolutos. Sin embargo esta mantención proporcional de la mayoría de los órganos estudiados no excluye alteraciones estructurales y funcionales profundas, no abordadas en este estudio, que tengan consecuencias a distintos niveles en la vida postnatal.

En lo que respecta al crecimiento de la musculatura, sabemos que esta tiene una gran relevancia en etapa fetal ya que cerca del 25 % del peso al nacimiento del cordero corresponde a musculo esquelético (Forhead *et al.*, 2012), el que consume alrededor del 60% de la glucosa disponible (Zhu *et al.*, 2006). A pesar de ello, se describe que el músculo es altamente sensible a las deficiencias nutricionales fetales, producto de una menor prioridad en la asignación de nutrientes, comparado con tejidos como cerebro, corazón o hígado (Zhu *et al.*, 2006). La manera en que la subnutrición materna afecta el desarrollo muscular, no solo está dada por el nivel, sino también por el momento y la duración de la restricción. Hay que considerar que el crecimiento muscular depende del número total de fibras musculares, el que se establece alrededor del día 85 de gestación (Fahey *et al.*, 2005). Luego de este periodo, el crecimiento está dado mayormente por la hipertrofia de las fibras musculares ya existentes (Rehfeldt *et al.*, 2000). Por ello, el menor peso del m. semitendinoso generado ante los

tratamientos de este estudio, se debería tanto a una menor hipertrofia como hiperplasia de las fibras musculares.

Los mecanismos que subyacen a la miogénesis y el crecimiento muscular son complejos y multifactoriales. Un mecanismo que regula el desarrollo muscular es la vía mTOR, que integra señales tanto del suministro de nutrientes maternos como de las demandas de energía del feto. Esta coordina una serie de vías metabólicas que regulan la acumulación de proteínas musculares y por tanto, la hipertrofia de la miofibra, que en la última etapa gestacional es la responsable del desarrollo muscular, el cual se encuentra acelerado (Brown, 2014).

El papel de la restricción de nutrientes maternos en la reducción de la activación de mTOR y el desarrollo del músculo fetal se ha demostrado en fetos ovinos con una restricción del 50% de los requerimientos nutricionales desde el día 28 hasta el 78 de la preñez (Zhu *et al.*, 2004). Se sabe, además, que los aminoácidos (AA) son esenciales para la síntesis de proteínas musculares. Mas allá de formar los componentes básicos de la proteína, se ha descrito que algunos aminoácidos (arginina, glutamina, leucina) tienen importantes efectos reguladores sobre la activación de la vía mTOR y la síntesis de proteínas musculares (Wu, 2009; Sales *et al.* 2013; Sales *et al.*, 2016).

Los antecedentes anteriores explican el efecto de la limitación nutricional sobre la masa del m. semitendinoso que fue un 7,3% menor en los grupos no suplementados. No obstante, este resultado no alcanzó nivel de significancia, a diferencia de la gestación mellicera que nuevamente tuvo un marcado y significativo efecto, el cual redujo en un 18,9% el peso del m. semitendinoso. Este resultado además de explicarse por la disminución relativa de nutrientes fetales en gestación mellicera, también puede responder al efecto de la hipoxia fetal producto de una insuficiencia placentaria (Wullschleger *et al.*, 2006), ya que los sensores de oxígeno como el factor inducible por hipoxia (HIF) y proteína quinasa activada por AMP (AMPK) podrían desempeñar un papel en la regulación del crecimiento muscular fetal, afectando la activación de mTOR y por lo tanto, el tamaño muscular, como ha sido reportado en humanos (Cindrova-Davies *et al.*, 2013). Reforzando esta idea, un estudio realizado por Sciascia *et al.* (2010), ha demostrado que efectivamente el músculo semitendinoso de los gemelos en los últimos meses del embarazo tiene una menor abundancia de proteínas de señalización mTOR, en comparación con los fetos únicos. Otra forma por la cual hipoxia fetal se puede vincular con un menor desarrollo muscular, es que esta se considera uno de los estímulos más potentes que aumenta la expresión de la proteína ligante

de IGF-1 (IGFBP-1) (Igwebuike, 2010), que regula la acción biológica de IGF-1, es decir su aumento en el plasma fetal disminuye la biodisponibilidad de IGF-1, factor crítico para el crecimiento y el anabolismo músculo esquelético (Osgerby *et al.*, 2002; Brown, 2014).

No hay que olvidar que los eventos que ocurren durante la vida fetal regulan, al menos en parte, la capacidad de crecimiento muscular postnatal, lo que restringe el rendimiento productivo del cordero mellizo. Así lo demuestra McCoard *et al.*, (2010), en un estudio en que los corderos mellizos obtuvieron un menor peso corporal y del m. semitendinoso al nacimiento, en comparación con los ejemplares únicos, lo cual estuvo de acuerdo con los hallazgos de Sales *et al.* (2014). Según este último, dichas diferencias persistieron al destete, y se registró una consistente disminución en la ganancia diaria de peso postnatal, la que se mantiene aun cuando los corderos mellizos son criados como únicos.

La menor masa muscular en individuos RCIU se mantiene incluso después de que se produzca el crecimiento postnatal compensatorio, ya que este favorece la deposición grasa y no el desarrollo muscular, dado que la hipertrofia muscular solo puede compensar parcialmente la limitación en el número de fibras (De Blasio *et al.* 2007).

10. CONCLUSIONES

1. La gestación mellicera y la subnutrición materna crónica, son condiciones que generan un menor peso fetal a término.
2. Tanto la subnutrición materna como la gestación mellicera generan un menor peso absoluto en la mayoría de los órganos fetales.
3. La subnutrición materna y la gestación mellicera no generan un cambio en el peso relativo en la mayoría de los órganos evaluados, con excepción de cerebro e hígado.
4. En general, la condición de mellicera genera efectos detrimentales en el crecimiento fetal de mayor magnitud en comparación con la subnutrición.

11. BIBLIOGRAFÍA

- BAJORIA, R., SOORANNA, S., WARD, S., HANCOCK, M.** 2002. Placenta as a link between amino acids, Insulin-IGF axis, and low birth weight: evidence from twin studies. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 87(1):308-315.
- BENTANCOR, V.** 2013. Efecto de la condición corporal y el peso al nacimiento del cordero sobre su comportamiento al nacimiento. Tesis Título Ingeniero Agrónomo. Montevideo, Uruguay. U. de la República. Fac. de Agronomía. 46 p.
- BOCCA-TJEETRS, I., BOS, A., KERSTJENS, J., WINTER, A., REIJNEVELD, S.** 2014. Symmetrical and asymmetrical growth restriction in preterm-born children. *Peds.* 133: 650-656.
- BROWN, L.** 2014. Endocrine regulation of fetal skeletal muscle growth: impact on future metabolic health. *J. Endocrinol.* 221:13-29.
- CLEAL, J., POORE, K., NEWMAN, J., NOAKES, D., HANSON, M., GREEN, L.** 2007. The effect of maternal undernutrition in early gestation on gestation length and fetal and postnatal growth in sheep. *Pediatr. Res.* 62:422–427.
- COCK, M., ALBUQUERQUE, -C., JOYCE, B., HOOPER, S., HARDING, R.** 2001. Effects of intrauterine growth restriction on lung liquid dynamics and lung development in fetal sheep. *Am. J. Obstet Gynecol.* 184:209-216.
- COX, P., MARTON, T.** 2009. Pathological assessment of intrauterine growth restriction. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 23:751-764.
- CRANSTON, L., KENYON, P., CORNER-THOMAS, R., MORRIS, T.** 2017. The potential interaction between ewe body condition score and nutrition during very late pregnancy and lactation on the performance of twin-bearing ewes and their lambs. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 30:1270–1277.
- DE BLASIO, M., GATFORD, K., ROBINSON, J., OWENS, J.** 2007. Placental restriction of fetal growth reduces size at birth and alters postnatal growth, feeding activity, and adiposity in the young lamb. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292:875-886.
- DEVASKAR, S., CHU, A.** 2016. Intrauterine growth restriction: hungry for an answer. *Physiol.* 31:131-146.
- DWYER, C., CALVERT, S., FARISH, M., DONBAVAND, J., PICKUP, H.** 2005. Breed, litter and parity effects on placental weight and placentome number, and consequences for the neonatal behavior of the Lamb. *Theriogenology* 63:1092-1110.

- FAHEY, A., BRAMELD, J., PARR, T., BUTTERY, P.** 2005. Ontogeny of factors associated with proliferation and differentiation of muscle in the ovine fetus. *J. Anim. Sci.* 83:2330-2338.
- FORHEAD, A., LI, J., GILMOUR, R., DAUNCEY, M., FOWDEN, A.** 2002. Thyroid hormones and the mRNA of the GH receptor and IGFs in skeletal muscle of fetal sheep. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282:80-86.
- FREETLY, H.; LEYMASTER, K.** 2004. Relationship between litter birth weight and litter size in six breeds of sheep. *J. Anim. Sci.* 82:612-618.
- FREITAS DE MELO, A., UNGERFELD, R., HÖTZEL, M.J., ABUD, M.J., ALVAREZ-OXILEY, A., ORIHUELA, A., DAMIÁN, J.P., PÉREZ CLARIGET, R.** 2015. Mother-young behaviours at lambing in grazing ewes: Effect of lamb sex and food restriction in pregnancy. *App. Anim. Behav. Sci.* 168:31-36.
- GAO, F., LIUL, Y., HOU, X.** 2009. Effect of maternal undernutrition during late pregnancy on growth and development of ovine fetal visceral organs. *J. Anim. Sci.* 22:1633-1639.
- GAO, F., LIU, Y., LI, L., LI, M., ZHANG, C., AO, C., HOU, X.** 2014. Effects of maternal undernutrition during late pregnancy on the development and function of ovine fetal liver. *Anim. Reprod. Sci.* 147:99-105.
- GARCÍA, I., OLIVA, J., OSORIO, M., TORRES, G., HINOJOSA, J., GONZALES, R.** 2017. Influencia materna en el crecimiento predestete y características de la canal de corderos de pelo. *Ecosist. Recur. Agropec.* 4:51-63.
- GLUCKMAN, P., HANSON, M.** 2004. Living with the past: Evolution, development, and patterns of disease. *Science.* 305:1733–1736.
- GONZALES-BULNES, A., ASTIZ, S., PARRAGUEZ, V., GARCÍA-CONTRERAS, C., VAZQUEZ-GÓMEZ, M.** 2016. Empowering translational research in fetal growth restriction: sheep and swine animal models. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 17:848-855.
- GOOTWINE, E., SPENCER, T., BAZER, F.** 2007. Litter-size-dependent intrauterine growth restriction in sheep. *Animal.* 1:547-564.
- GOOTWINE, E.** 2014. Meta-analysis of morphometric parameters of late-gestation fetal sheep developed under natural and artificial constraints. *J. Anim. Sci.* 91:111-119.
- HANCOCK, S., OLIVER, M., MCLEAN, C., JAQUIERY, A. BLOOMFIELD, F.** 2012. Size at birth and adult fat mass in twin sheep are determined in early gestation. *J. Physiol.* 590: 1273-1285.

- HATCHER, S., ATKINS, K., SAFARI, E.** 2014. Phenotypic aspects of lamb survival in Australian Merino sheep. *J. Anim. Sci.* 87:2781-2790.
- HERVÉ, M.** 2013. Carne ovina: Producción, características y oportunidades en lo que hoy demanda el consumidor nacional e internacional. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), Santiago, Chile.
- IGWEBUIKE, U.** 2010. Impact of maternal nutrition on ovine foetoplacental development: A review of the role of insulin-like growth factors. *Anim. Reprod. Sci.* 121:189-196.
- INE. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS.** 2007. Censo Agropecuario y Forestal. [en línea].< <http://www.ine.cl/estadisticas/economicas/estad%C3%ADsticas-agropecuarias>> [consulta : 02-11-2017].
- LIRA, R.** 2012. Suplementación estratégica **In**: Strauch, O.; Lira, R. Bases para la producción ovina en Magallanes. INIA Kampenaike. Punta Arenas, Chile pp. 92-103.
- LUEBERT, F., PLISCOFF, P.** 2006. Sinopsis bioclimática y vegetal de Chile. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. 323 p.
- MCCOARD, S.A., MCNABB, W., PETERSON, S., MCCUTCHEON, S., HARRIS, P.** 2000. Muscle growth, cell number, type and morphometry in single and twin fetal lambs during mid to late gestation. *Reprod. Fertil. Dev.* 12:319-327.
- MCCOARD, S.A., KOOLAARDRD, J., CHARTERIS, A., LUO, D.,** 2010. Effect of twinning and sex on carcass weight and composition in lambs. *Proc. New. Zeal. Soc. An.* 70:133-136.
- MCCOARD, S., SALES, F., SCIASCIA, L.** 2017. Invited review: impact of specific nutrient interventions during mid-to-late gestation on physiological traits important for survival of multiple-born lambs. *Animal.* 11:1727-1736.
- MORRISON, J.** 2008. Sheep models of intrauterine growth restriction: Fetal adaptations and consequences. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35:730–743.
- NEWBERN, D.; FREEMARK, M.** 2011. Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. *Curr. Opin. Endocrinol. Diab. Obes.* 18:409–416.
- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL.** (1985). Nutrient requirements of sheep. 6th ed. National Academy Press, Washington, D.C. 120 p.
- OSGERBY, J., GADD, T., WATHES, D.** 2003. The effects of maternal nutrition and body condition on placental and foetal growth in the ewe. *Placenta.* 24:236-247.

- OSGERBY, J., WATHES, D., HOWARD, D., GADD, T.** 2002. The effect of maternal undernutrition on ovine fetal growth. *Int J Endocrinol.* 173:131-141.
- PARRAGUEZ, V., ATLAGICH, M.; DÍAZ, R., BRUZZONE, M., BEHN, C., RAGGI, L.** (2005). Effect of hypobaric hypoxia on lamb intrauterine growth: comparison between high- and low-altitude native ewes. *Reprod. Fertil. Dev.* 17:497-505.
- PARRAGUEZ, V., ATLAGICH, M., DÍAZ, R.; CEPEDA, R., GONZÁLEZ, C., DE LOS REYES, M., BRUZZONE, M., BEHN, C., RAGGI L.A.** 2006. Ovine placenta at high altitudes: comparison of animals with different times of adaptation to hypoxic environment. *Anim. Reprod. Sci.* 95:151-157.
- PÉREZ, P.** 2010. Mortalidad neonatal o perinatal de corderos. *TecnoVet* 16:40-47.
- PHILLIPS, I., SIMONETTA, G., OWENS, J., ROBINSON, J., CLARKE, I., MCMILLEN, I.** 1996. Placental restriction alters the functional development of the pituitary-adrenal axis in the sheep fetus during late gestation. *Pediatr Res.* 40:861–866.
- POUDEL, R., MCMILLEN, C., DUNN, S., ZHANG, S., MORRISON, J.** 2015. Impact of chronic hypoxemia on blood flow to the brain, heart, and adrenal gland in the late-gestation IUGR sheep fetus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol.* 308:151-162.
- REHFELDT, C., FIEDLER, I., DIETL, G., ENDER, K.** 2000. Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. *Lives. Prod. Sci.* 66:177-188.
- RUMBALL, C., HARDING, J., OLIVER, M., BLOOMFIELD, F.** 2008. Effects of twin pregnancy and periconceptional undernutrition on maternal metabolism, fetal growth and glucose-insulin axis function in ovine pregnancy. *J. Physiol.* 586:1399-1411.
- SAEVRE, C., CATON, J., LUTHER, J., MEYER, A., DHUYVETTER, D., MUSSER, R., KIRSCH, J., KAPPAHN, M., REDMER, D., SCHAUER, C.** 2010. Effects of rumen-protected arginine supplementation on ewe serum amino acid concentration, circulating progesterone, and ovarian blood flow. *Proc. West. Sect. Am. Soc. Anim. Sci.* 61:7-10.
- SALES, F., PACHECO, D., BLAIR, H., KENYON, P., MCCOARD, S.** 2013. Muscle free amino acid profiles are related to differences in skeletal muscle growth between single and twin ovine fetuses near term. *SpringerPlus.* 2:483.
- SALES, F., PACHECO, D., BLAIR, H., KENYON, P., MCCOARD, S.** 2014. Identification of amino acids associated with skeletal muscle 1 growth in late gestation and at weaning in lambs of well-nourished sheep *J. Anim. Sci.* 92:5041–5052.

- SALES, F., SCIASCIA, Q., VAN DER LINDEN, D., WARDS, N., OLIVER, M., MCCOARD, S.** 2016. Intravenous maternal l-arginine administration to twin-bearing ewes, during late pregnancy, is associated with increased fetal muscle mTor abundance and postnatal growth in twin female lambs. *J. Anim. Sci.* 94:2519-2531.
- SALES, F., PERALTA, O., NARBONA, E., MACCOARD, S., DE LOS REYES, M., GONZÁLEZ-BULNES, A., PARRAGUEZ, V.** 2018. Hypoxia and oxidative stress are associated with reduced fetal growth in twin and undernourished sheep pregnancies. *J. Anim.* 8:217.
- SCIASCIA, Q., PACHECO, D., BRACEGIRDLE, J., BERRY, C., KENYON, P., SALERNO, M., NICHOLAS, G., MCCOARD, S.** 2010. Brief Communication: Effects of restricted fetal nutrition in utero on mTOR signalling in ovine skeletal muscle. *Proc. NZ Soc. Anim. Prod.* 70:180-182
- SEPÚLVEDA, E., CRISPI, F., PONS, A., GRATACOS, E.** 2014. Restricción de crecimiento intrauterino. *Med. Clin. Condes.* 25:958-963.
- SHOENIAN, S.G., BURFENING, P.J.** 1990. Ovulation rate, lambing rate, litter size and embryo survival of Rambouillet sheep selected for high and low reproductive rate. *J. Anim. Sci.* 68:2263-2270.
- SORIA, R., JULIAN, C., VARGAS, E., MOOE, L., GIUSSANI, D.** 2013. Graduated effects of high-altitude hypoxia and highland ancestry on birth size. *Pediatr. Res.* 74:633-638.
- SUBDERE.** 2012. Subsecretaría de Desarrollo Regional (SUBDERE), Santiago, Chile.
- VAN DER LINDEN, D., SCIASCIA, Q., SALES, F., MACCOARD, S.** 2014. Placental nutrient transport is affected by pregnancy rank in sheep. *J. Anim. Sci.* 91:644-653.
- VONNAHME, K., EVONIUK, J., LYNN, M., BOROWICZ, P., LUTHER, J., PANT, D., REDMER, D., REYNOLS, L., GRAZUL-BILSKA, A.,** 2008. Placental vascularity and growth factor expression in singleton, twin, and triplet pregnancies in the sheep. *Endocr.* 33:53-61.
- WERNLI, C., DOBERT, H., SCHMITT, J., ALONSO, O., CERDA, D.** (1977). Estudios sobre el valor nutritivo de las praderas en Magallanes. Boletín Técnico No 10. Estación Experimental Kampenaike-Estación Experimental La Platina., 54 p.
- WU, G.** 2009. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino. Acids.* 37:1–17.

- WULLSCHLEGER, S., LOEWITH, R., HALL, MN.** 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124:471–484.
- YOUNOSZAI, M., FOMON, S.** 1971. Gastroenterology and enzymology: Growth of the small intestine in IUGR and normal rat pups. *Pediatr. Res.* 5:386.
- ZHU, M., FORD, S., MEANS, W., HESS, B., NATHANIELSZ, P., DU, M.** 2006. Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *J. Physiol.* 575:241-50.
- ZHU, M., FORD, S., NATHANIELSZ, P., DU, M.** 2004. Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biol. Reprod.* 71:1968-1973.



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

Santiago, 14 de junio de 2016

CERTIFICADO N° 11-2016

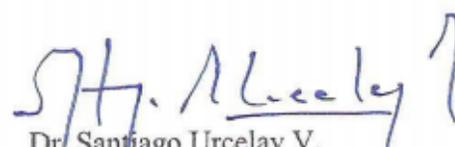
En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, y teniendo a la vista la metodología del Proyecto: **“Roles of hypoxia and oxidative stress on lamb fetal growth restriction by twin pregnancy and/or undernutrition: intervention with antioxidants”**. Este comité entiende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

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

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


Dra. Tamara Tadić G.
Director
Comité de Bioética Animal




Dr. Santiago Urcelay V.
Presidente
Comité de Bioética Animal