



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EVALUACIÓN DE UN DISPOSITIVO ELETROQUÍMICO PARA LA
DETERMINACIÓN A CAMPO DE β - HIDROXIBUTIRATO EN SANGRE DE
OVINOS**

Por

Estela CHARLE

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: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2017**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dr. Alejandro Benech

Segundo miembro (Tutor):

Dr. Luis Cal Pereyra

Tercer miembro:

Dra. Cecilia Abreu

Cuarto miembro

Dr. Pablo Rodríguez

Fecha:

08 /03 /2017

Autor:

Br. Estela Emilia Charle Pérez

AGRADECIMIENTOS

En primera lugar a mi familia por el apoyo y la ayuda continua permitiendo que hoy este ante esta instancia. A mis tutores Dr. Luis Cal Pereyra y Dr. Pablo Rodríguez por los conocimientos transmitidos así como por el tiempo y la dedicación brindada. A mis amigos por los momentos compartidos. A la Facultad de Veterinaria por la inserción en la profesión y al Campo Experimental N° 2 por haber cedido el espacio y los animales para realizar el ensayo. A mis compañeros de tesis: Cecilia Russi, Cecilia Villagran, Luis Nicodella, Maximiliano Debeza, Federico Feijo y Álvaro Loreto. Al Dr. Gonzalo Rosés por su ayuda en el diagnóstico de gestación realizando las ecografías y a Sebastián Da Rosa por el procesamiento de las muestras de laboratorio. Al Dr. Andrés Gil por la colaboración en el análisis estadístico.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
AGRADECIMIENTOS	¡Error! Marcador no definido.
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	¡Error! Marcador no definido.
RESUMEN.....	¡Error! Marcador no definido.
SUMMARY	¡Error! Marcador no definido.
1 INTRODUCCIÓN.....	9
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Demandas nutricionales de los ovinos.....	11
2.2 Fisiología de la digestión ruminal.....	11
2.3 Metabolismo energético.....	12
2.4 La neoglucogénesis.....	12
2.5 Metabolismo energético de la oveja gestante.....	13
2.6 Balance energético negativo y modificaciones metabólicas.....	13
2.7 Metabolismo del tejido adiposo.....	14
2.8 Los cuerpos cetónicos.....	15
2.9 Relación entre neoglucogénesis y cetogénesis.....	17
2.10 Regulación de la homeostasis energética.....	17
2.11 Toxemia de la gestación.....	18
2.11.1 Introducción.....	18
2.11.2 Etiología.....	18
2.11.3 Patogenia.....	18
2.11.4 Diagnóstico subclínico.....	20
2.11.5 Diagnóstico clínico en laboratorio.....	21
2.12 Cetoacidosis diabética en humanos.....	22
3 HIPÓTESIS.....	23

4	OBJETIVOS.....	23
4.1	Objetivo general.....	23
4.2	Objetivos específicos.....	23
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5.1	Lugar.....	24
5.2	Diseño experimental.....	24
5.2.1	Animales.....	24
5.2.2	Diseño del protocolo.....	24
5.3.3	Determinaciones en sangre.....	25
5.3.3.1	Determinación de β -hidroxibutirato.....	25
5.2.3.2	Determinación de glucosa.....	25
5.3	Análisis de las muestras.....	26
5.3.1	En el laboratorio.....	26
5.3.2	A campo.....	26
5.4	Análisis estadístico.....	26
6	RESULTADOS.....	27
7	DISCUSIÓN.....	33
8	CONCLUSIONES.....	34
9	BIBLIOGRAFÍA.....	35

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURA 1. Evolución de la glicemia.....	27
FIGURA 2. Coeficiente de concordancia entre métodos.....	31
FIGURA 3. Diferencias de los resultados de BHOB entre métodos.....	32
TABLA 1. Valores séricos de BOHB al día 125 de la gestación.....	28
TABLA 2. Valores séricos de BOHB al día 145 de la gestación.....	29
TABLA 3. Valores séricos de BOHB a las 72 horas posparto.....	30

RESUMEN

La toxemia de la gestación subclínica se produce con mayor frecuencia que la clínica y tiene una importancia económica significativa. El objetivo de este trabajo fue evaluar un dispositivo electroquímico para la determinación a campo de β -hidroxibutirato en sangre de ovinos. Se utilizaron 40 ovejas Corriedale adultas de las cuales 21 gestaban un solo feto, 9 gestaban mellizos y 10 se encontraban vacías. En el día 125 de gestación los animales se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos (A, B, C y D). El Grupo A (n=11) gestando un cordero único y el grupo B (n=9) gestando mellizos fueron encerradas en corrales techados y con piso de hormigón. Durante el encierro fueron sometidas a una restricción alimentaria, con libre acceso al agua. El Grupo C (n=10) gestando un solo cordero y el Grupo D (n=10) ovejas vacías que continuaron alimentándose libremente durante todo el ensayo. Todas las ovejas fueron sangradas a los 125 y 145 días de gestación y a las 72 horas de producido el parto para valorar la concentración sérica de BOHB en el laboratorio. Al obtener la muestra de sangre se determinó a campo la concentración de este cuerpo cetónico utilizando tiras reactivas FreeStyle Optium®. A partir del comienzo del encierro las ovejas de los grupos A y B fueron sangradas cada 24 horas hasta 72 horas posteriores a que la glicemia alcanzó valores considerados de riesgo ($28,62 \pm 4,33$ mg/dl) los cuales definen la toxemia de la gestación subclínica. A partir del día 125 de la gestación se observó una disminución de la glicemia en los grupos A y B, alcanzando a los 16 días de comenzada la restricción de alimentos, valores medios de $28,67 \pm 6,64$ y $27,71 \pm 5,62$ mg/dl respectivamente. Los resultados obtenidos a campo mediante la utilización del dispositivo electroquímico para la determinación de β -hidroxibutirato en sangre de ovejas vacías, así como en ovinos con toxemia subclínica gestando un solo cordero o mellizos, mostraron un acuerdo moderado con los obtenidos a través del método enzimático colorimétrico de laboratorio para valores menores a 2mmol/l. Con el fin de establecer la concordancia entre ambos métodos, para concentraciones de BOHB superiores a 2 mmol/l, sería necesario obtener un mayor número de muestras que permita su análisis estadístico.

SUMMARY

Subclinical gestation toxemia occurs more frequently than the clinical one and it has a significant economic importance. The objective of this work was to evaluate an electrochemical device for the field determination of β -hydroxybutyrate in sheep blood. Forty adult Corriedale sheep were used, of which 21 were single fetus, 9 were twin and 10 were empty. On day 125 of gestation the animals were randomly divided into four groups (A, B, C, and D). Group A (n = 11) with a single lamb and group B (n = 9), with twins breeding, were housed in roofed corrals and with a concrete floor. During the confinement they were subjected to food restriction, with free access to water. Group C (n = 10) breeding a single lamb and Group D (n = 10), empty sheep that continued to feed freely throughout the trial. All sheep were bled at 125, 145 days of gestation and at 72 hours after birth to assess the serum BOHB concentration in the laboratory. Upon obtaining the blood sample the concentration of this ketone body was determined in the field using FreeStyle Optium® test strips. From the beginning of confinement, the sheep of groups A and B were bled every 24 hours up to 72 hours after glycemia reached values considered to be at risk (28.62 ± 4.33 mg / dl), which define the toxemia of Subclinical gestation. From day 125 of gestation, there was a decrease in glycemia in groups A and B, reaching at 16 days of food restriction, mean values of 28.67 ± 6.64 and $27.71 \pm 5, 62$ mg / dl respectively. The results obtained in the field using the electrochemical device for the determination of β -hydroxybutyrate in blood of empty sheep, as well as in sheep with subclinical toxemia with a single lamb or twins, showed a moderate agreement with those obtained through the enzymatic method Laboratory colorimetric values for values lower than 2mmol / l. In order to establish the agreement between both methods, for BOHB concentrations higher than 2 mmol/l, it would be necessary to obtain a larger number of samples to allow statistical analysis.

1 INTRODUCCIÓN

En la historia del desarrollo económico y social del Uruguay el sector ovino ha sido uno de los grandes actores, distinguiendo al país y constituyendo un rol fundamental en el aporte de materia prima para las industrias cárnica y lanera, además de proveer alimento en el medio rural (SUL, 2016).

Nuestro país es uno de los principales exportadores a nivel mundial de lana y carne ovina. Ocupa el segundo lugar en los mercados laneros más exigentes a través de la lana lavada y peinada (tops) y es el sexto como país exportador de lana lavada y en estado natural. En cuanto a la carne es el tercer exportador en el mundo, siendo el cordero pesado el principal producto exportado a nivel nacional (SUL, 2015).

Dentro de la estructura exportadora del país, la producción ovina constituye una porción muy importante. Es así que durante el año 2015 por concepto de exportaciones de los productos que componen el Rubro Ovino (lanas y productos de lana, carne, pieles y ovinos en pie), ingresaron a Uruguay un total de 324 millones de dólares. Es por esto que el rubro ovino constituye una fuente de trabajo a través de toda la cadena comercial, lo cual implica inversiones en diferentes puntos del país favoreciendo, entre otras cosas, la radicación de personas en el medio rural (SUL, 2015).

En Uruguay la raza ovina más criada es la Corriedale, llegando al país en 1916. Constituye un ovino de doble aptitud, carne y lana, que se adapta muy bien a las condiciones extensivas y semiintensivas, siendo capaz de aprovechar la pradera natural pobre en cantidad y calidad alimentaria y resistiendo en buena forma las condiciones climáticas desfavorables de invierno y comienzos de primavera (Cal L, 2007).

Sin embargo, existen graves problemas como la baja eficiencia reproductiva y el elevado porcentaje de mortandad ovina los cuales constituyen unas de las principales restricciones productivas (Charamelo y Grau, 2013). Los bajos índices de señalada logrados fueron en parte responsables de la drástica reducción del stock ovino nacional, desde el récord de 26 millones de cabezas en el año 1991, hasta los 6.4 millones que existen actualmente (SNIG, 2016; OPYPA, 2016).

Es por esto que, hoy en día, encontrar caminos de crecimiento de la producción ovina es un desafío establecido. Son muchos los temas a tener en cuenta, pero sin dudas constituye un objetivo básico en toda explotación ovina la obtención de un alto número de corderos destetados por oveja cubierta. La investigación dirigida a evitar la mortalidad de las madres, disponiendo de valores de referencia como indicadores del metabolismo energético resulta necesaria para tomar medidas tendientes a la prevención y/o tratamiento precoz de trastornos metabólicos como lo es la toxemia de la gestación ovina (Charamelo y Grau, 2013). Enfermedad que, sin dudas, es una causa importante de muerte de ovejas en nuestro país (Cal Pereyra, 2007; Cal Pereyra y col, 2012).

La toxemia de la gestación subclínica se produce con mayor frecuencia que la clínica y tiene una importancia económica significativa (Radostits y col, 2001). Según

Bonino y col. (1987) es importante tener en cuenta que el diagnóstico de casos clínicos de toxemia de la preñez refleja la existencia de un importante problema metabólico subclínico a nivel de la majada. La monitorización del rebaño ovino para la toxemia latente de la gestación durante las últimas 6 semanas de la gestación puede reducir pérdidas de ovejas y sus crías a causa de esta patología (Contreras, 1998; Radostits y col, 2001).

Este trabajo propone la validación de una alternativa para delimitar y diagnosticar a campo, rápida y económicamente la toxemia de la gestación subclínica a través de un dispositivo electroquímico que determine la concentración de β -hidroxibutirato en sangre de ovinos.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Demandas nutricionales de los ovinos

Los sistemas extensivos en los que se desarrolla la ganadería ovina en Uruguay, basan su existencia exclusivamente en el aporte nutricional de las pasturas naturales. La cantidad de forraje disponible para el consumo, su composición botánica y el estado fenológico de la vegetación determinan una alta variabilidad de los aportes nutritivos para estos sistemas productivos. Además esta variabilidad está condicionada por las distintas épocas del año y las condiciones ambientales de temperatura, lluvias, heladas y radiación solar (Orcasberro, 1985; Gibbons, 1996).

Los ovinos así como el resto de los animales deben satisfacer las necesidades de alimento para mantenerse vivos y producir. Esto implica una demanda diaria de nutrientes que deben ingerirse con la dieta estableciéndose así los requerimientos de los animales. El total de energía requerida diariamente por ellos supone la suma de varios costos parciales de energía, como son el metabolismo de ayuno, la termorregulación, la actividad, la gestación, la lactación y el crecimiento en animales jóvenes (Borrelli, 2001).

Según su estado fisiológico las necesidades nutritivas de la oveja varían (Gibbons, 1996). Durante la preñez el crecimiento del feto, placenta, útero y líquido amniótico requieren energía adicional. En las ovejas el aumento de peso del feto es pequeño durante los primeros meses de la gestación, aproximadamente el 15% del peso al nacer, incrementándose bruscamente en los últimos 60 días, donde llega al 85 % del peso que tendrá al nacer. Necesariamente esto implicará un aumento del pasaje de glucosa al feto. (Russel, 1984). Lógicamente además, las gestaciones múltiples aumentan considerablemente esta demanda de energía (Rook, 2000; Harmeyer y Schlumbohm, 2006).

A medida que transcurre la gestación, la capacidad física del rumen va reduciéndose por el aumento del volumen del útero, además hay una disminución concomitante del apetito, con lo cual el animal reduce la cantidad de alimento que ingiere (Cirio y Tebot, 2000). Esto sumado a los altos requerimientos que presenta el individuo, lleva a la movilización de las reservas corporales (Gibbons, 1996).

2.2 Fisiología de la digestión ruminal

En los rumiantes los carbohidratos son atacados por la micropoblación ruminal con producción de ácidos grasos volátiles (AGV), anhídrido carbónico y metano. Los AGV están fundamentalmente representados por los ácidos acético, propiónico y butírico, en una proporción dependiente del tipo de alimentación. En ovinos que reciben forrajes groseros, la relación entre AGV es de 70:20:10, mientras que las dietas a base de concentrados pueden invertir estos valores a favor del ácido propiónico (Bonino y Col, 1987).

Los AGV son absorbidos a nivel de las papilas ruminales por mecanismos de gradiente de concentración. Una parte del acetato se utiliza en el hígado para la

síntesis de grasa y el resto puede tomar dos caminos metabólicos, ser oxidados en el músculo o actuar como sustrato para la síntesis de grasa corporal o láctea (Cirio y Tebot, 2000).

En la pared ruminal el propionato es parcialmente transformado en lactato y ambos son transformados en glucosa en el hígado, mientras que el butirato es rápidamente absorbido en el rumen y transformado a este nivel en cuerpos cetónicos. El propionato es el principal precursor de la glucosa, comportándose como glucogénico y anticetogénico. El acetato y el butirato, por el contrario, no son utilizados en la síntesis de glucosa por lo que se consideran cetogénicos (Bonino y col, 1987; Cal Pereyra, 2007).

2. 3 Metabolismo energético

La glucosa es un metabolito de gran importancia dentro del metabolismo energético ya que es el principal sustrato energético del cerebro, siendo fundamental además para la síntesis de triglicéridos, el aporte de energía al feto, la contracción muscular y la síntesis de lactosa en la glándula mamaria (Bonino y col, 1987).

Dentro de los requerimientos calóricos de los rumiantes los AGV aportan el 70% y como la digestión microbiana precede al duodeno, la absorción de glucosa de origen alimentario es muy baja, representando del 15 al 30% de la utilizada por el animal. Esto obliga al rumiante a obtener la mayor parte de la glucosa que necesita por vía de la neoglucogénesis (NG) o síntesis de glucosa a partir de no hexosas, siendo esta vía en definitiva la que determina el valor de la glicemia que oscila entre 50-70 mg/dl (Bonino y col, 1987; Cirio y Tebot, 2000).

Los carbohidratos, los aminoácidos y las grasas forman las reservas energéticas del cuerpo. El tejido adiposo es el que cierra el balance energético del animal almacenando energía frente a excedentes o movilizándola frente a la demanda (Borrelli, 2001).

2. 4 La neoglucogénesis

A pesar del bajísimo aporte exógeno las necesidades en glucosa del rumiante son similares a las de los monogástricos y por lo tanto el proceso de la NG es permanente y tienen una importancia capital. El 90 % de esta actividad metabólica se realiza en el hígado y el 10 % restante en el riñón (Cirio y Tebot, 2000).

Los principales precursores de la NG son el ácido propiónico, los aminoácidos glucoformadores, el lactato y el glicerol (Cirio y Tebot, 2000). El propionato es el precursor más importante en condiciones de alimentación normal y proviene exclusivamente de la fermentación ruminal. El lactato proviene de la digestión ruminal, fundamentalmente cuando la alimentación es rica en granos que contienen carbohidratos solubles fácilmente fermentescibles, produciéndose cantidades adicionales de lactato por transformación parcial del ácido propiónico en la pared del rumen. Los aminoácidos provienen de la alimentación y del metabolismo, y el

glicerol tiene su origen en la lipólisis que tiene lugar en el adipocito (Demigné y col, 1988; Cirio y Tebot, 2000).

El propionato es el sustrato glucoformador más eficaz y asegura, según la alimentación y el estado fisiológico del animal, entre un 50 y un 70 % de las necesidades de la NG (Ndi bualonji y Godeau, 1993).

Cuando el animal está en ayunas o la alimentación es insuficiente la importancia de los distintos precursores se modifica. Los aportes de propionato y en menor medida de lactato se ven reducidos, ya que ambos provienen de la alimentación. Los aminoácidos también provienen de la alimentación, pero en caso de ayuno el animal puede disponer hasta cierto punto de sus proteínas. El glicerol adquiere así mayor importancia, ya que el animal incrementa su lipólisis; de esta manera el glicerol de origen endógeno y el propionato de origen exógeno tienden a sustituirse mutuamente como precursores de la NG, según el estado nutricional y energético del animal (Bergman y col, 1966; Ndi bualonji y Godeau, 1993; Cirio y Tebot, 2000).

2. 5 Metabolismo energético de la oveja gestante

Según su estado fisiológico las necesidades nutritivas de la oveja varían. Es así que, principalmente durante los últimos 60 días de gestación los requerimientos nutricionales son máximos (Borrelli, 2001; Gibbons, 1996; Orcasberro, 1985). Esto se debe a que durante este período, hay un aumento muy importante en el peso del feto, ya que acumula aproximadamente el 85 % del peso al nacer (East, 1983; Russel, 1984; Robinson, 1996). Además, el crecimiento y desarrollo de los tejidos altamente especializados del feto son más costosos, en términos de nutrientes necesitando más alimento por unidad de peso ganado que en el caso del animal adulto. Más allá de esto el ovino gestante es capaz de mantener los aportes nutricionales del feto a expensas de sus reservas corporales teniendo así mayor impacto el efecto del déficit nutricional en la madre que en el feto (Gibbons, 1996).

El requerimiento feto-placentario de energía puede llegar a representar hasta el 45 % de la glucosa materna y el 72 % de la oferta de aminoácidos maternos (Bell, 1995). A este significativo aumento de los requerimientos de energía se agrega una disminución de la ingesta de alimento ya que el volumen ocupado por el feto reduce la capacidad del rumen y hay además una disminución concomitante del apetito (Cirio y Tebot, 2000). A consecuencia de estos sucesos indefectiblemente el organismo recurre a la movilización de las reservas corporales. La magnitud de esta movilización dependerá de la cantidad de tejido adiposo que disponga la oveja y la diferencia entre el consumo y la demanda de nutrientes (Gibbons, 1996).

2. 6 Balance energético negativo y modificaciones metabólicas

Cuando el rumiante enfrenta un período de alta exigencia energética como la gestación terminal en las ovejas o la lactación en las vacas atraviesan un balance energético negativo (BEN) dado que los aportes a través de la ingestión son inferiores a los requerimientos. Es por esto que, los individuos recurren a la

metabolización de sus reservas lipídicas para obtener la energía que les está faltando, proceso que se denomina lipomovilización (Cirio y Tebot, 2000).

En los ovinos el importante desvío de glucosa y lactato hacia el feto lleva a un déficit en la disponibilidad de la glucosa para proveer de energía a los diferentes tejidos de la madre que se intenta equilibrar con la liberación de una cantidad importante de energía contenida en los ácidos grasos no esterificados (AGNE) a través de la lipomovilización (Cirio y Tebot, 2000).

En BEN el nutriente más limitante es la glucosa, ya que en los rumiantes ésta debe ser sintetizada mediante NG hepática a partir de precursores, cuyo aporte es variable de acuerdo a los requerimientos (Contreras, 1998). El tejido adiposo y el hígado resultan críticos en este momento para la adaptación metabólica. El primero aporta los sustratos para que el segundo pueda actuar como regulador de la concentración de la glucosa sanguínea y realice el correspondiente aporte de glucosa a los diferentes tejidos (Cal, 2007).

2. 7 Metabolismo del tejido adiposo

La reserva corporal de energía está dada por el tejido adiposo. Está formado por los adipocitos, células llenas de triacilglicéridos (TAG). Las moléculas de TAG están formadas, a su vez, por tres ácidos grasos de cadena larga esterificados a una molécula de glicerol, activado bajo forma de alfa glicerofosfato (α -GP) (Cirio y Tebot, 2000).

El metabolismo de los lípidos se centra en dos grandes vías: lipogénesis (producción y depósito de grasa de reserva) y lipólisis (liberación de las grasa almacenadas) (Cal, 2007).

La lipólisis es la movilización de las grasa de los tejidos de depósito (TAG) por degradación a glicerol y AGNE. Los ácidos grasos son transportados en el torrente sanguíneo unidos a albúminas específicas y el glicerol es transportado en solución (Contreras, 1998).

La lipogénesis de los TAG que serán depositados como reserva en el adipocito se realiza por esterificación de α GP con ácidos grasos. Estos últimos pueden tener triple origen: a) Ser sintetizados en el propio tejido adiposo a partir de moléculas de pequeño tamaño (síntesis de novo), b) ser captados preformados de la sangre y c) provenir de la lipólisis de los TAG del propio adipocito (endógenos).

La regulación del metabolismo lipídico del adipocito está dada fundamentalmente por la insulina siendo su efecto global favorecer el depósito de grasas de reserva a partir de ácidos grasos de cualquier origen (Cirio y Tebot, 2000). Mientras que el glucagón, somatotrofina, las catecolaminas y los glucocorticoides tienen efecto lipolítico en el adipocito (Bonino y col, 1987).

En el hígado el glicerol es transformado en α GP y puede servir para la NG o para la resíntesis de TAG (esterificación) (Chilliard, 1987; Cirio y Tebot, 2000).

Los AGNE captados por el hepatocito y activados a acil-CoA en el citosol, pueden ser dirigidos hacia la resíntesis de TAG o hacia su utilización intramitocondrial en el proceso de β -oxidación. Esta vía metabólica se puede llevar a cabo también en el músculo o en el tejido adiposo pardo (Contreras, 1998; Cirio y Tebot, 2000). A través de la β -oxidación se lleva la acil-CoA hasta acetil-CoA, quien podrá ser quemada en el ciclo de Krebs o generar cuerpos cetónicos (CC) (Michaux y col, 1981; Chilliard, 1987; Contreras, 1998).

La acetil-CoA en el interior de la mitocondria tiene dos caminos. Una de las alternativas es unirse con el oxalacetato (OAA) por acción de la citrato sintetasa (primera enzima del ciclo de Krebs), lo que determinará su oxidación total hasta CO₂ y H₂O, con producción de energía. Pero puede también, cuando la cantidad de grasa movilizada excede la capacidad de oxidación del hígado, no ingresar al ciclo de Krebs, por insuficiencia de OAA y así el acetil-CoA excedente da origen a los CC (Michaux y col, 1981; Contreras, 1998; Cirio y Tebot, 2000; Radostits y Col, 2001). En estas circunstancias el exceso de ácidos grasos que ingresan al hepatocito no se oxidan, se reesterifican, dando origen a los TAG dentro de la célula hepática (Herdt, 1988).

Tres eventos asociados con la grasa corporal tienen entonces una importante influencia sobre el suministro de energía y carbohidratos. El primero es que se liberan ácidos grasos del tejido adiposo, el segundo es que estos ácidos grasos ingresan al hígado y el tercero es que los ácidos grasos ingresan dentro de las mitocondrias de los hepatocitos. En el animal normal estos eventos forman parte de un sistema homeostático que permite mantener la energía y un suministro adecuado de carbohidratos (Herdt y Emery, 1992).

El metabolismo del tejido adiposo del rumiante se caracteriza por una lipogénesis y una lipólisis débil, al comienzo de la gestación y durante las etapas no productivas. El último tercio de la gestación y los períodos de fuerte producción láctea se acompañan de una reducción marcada de la lipogénesis y de una activación de la lipólisis (Cirio y Tebot, 2000).

2. 8 Los cuerpos cetónicos

Los CC son un componente normal de la sangre y su sola presencia no constituye enfermedad (Cirio y Tebot, 2000; Radostits y col, 2001). Son intermediarios normales del metabolismo celular y constituyen un importante substrato energético ya que proveen acetil-CoA al ser degradados (Radostits y col, 2001). Es por ello que muchos tejidos periféricos tales como el corazón, el músculo esquelético, los riñones, los tejidos uterinos no fetales y la glándula mamaria pueden obtener una importante cantidad de energía al oxidar los CC (Michaux y col, 1981; Heitmann y col, 1987). Sin embargo, el cerebro y los tejidos fetales no son capaces de utilizarlos como fuente de energía (Bergman, 1971; Heitmann y col, 1987).

Los CC son el ácido acetoacético, β -hidroxibutírico (BOHB), acetona y en menor cantidad el isopropanol. Son derivados hidrosolubles de los ácidos grasos (Díez Prieto y col, 1998). En ovejas en ayuno el BOHB representa entre el 70 y el 90% del total de CC que son producidos por el hígado (Brockman y Laarveld, 1985).

La pared del rumen y el hígado son los dos lugares de síntesis de CC (Radostits y Col, 2001). En la pared del rumen la cetogénesis ocurre durante la absorción del ácido butírico ya que una parte se transforma en BOHB; dependiendo del tipo de alimentación la cantidad que se forma de este cuerpo cetónico. En el hígado la cetogénesis se realiza a partir de la aceti-CoA. La cantidad de CC que se forman en éste órgano depende de la magnitud de la lipomovilización (Cirio y Tebot, 2000). La producción de acetyl CoA puede tener su origen en la degradación del ácido pirúvico, de la degradación de ciertos aminoácidos, del catabolismo de los ácidos grasos y de los AGV (acetato y butirato) (Michaux y col, 1981).

La mayor fuente de producción neta de CC en la oveja bien alimentada es el epitelio ruminal. Durante el final de la gestación y durante el principio de la lactación la proporción de CC producidos por el hígado usualmente se incrementa. Bajo estas condiciones o ante una disminución del aporte de energía, por ejemplo por ayuno, la cetogénesis alimentaria disminuye y la producción de CC a partir de los AGNE se incrementa desproporcionadamente siendo entonces el principal y eventualmente único órgano de producción el hígado (Harmeyer y Schlumbohm, 2006).

Dentro de las mitocondrias de los hepatocitos son elaborados la mayoría de los CC. El proceso comienza en el acetyl-CoA que proviene fundamentalmente de la β -oxidación. En presencia de la enzima β -cetotiosa, dos moléculas de acetyl-CoA se condensan para formar el acetoacetyl CoA. Éste incorpora una tercera molécula de acetyl CoA con la cual forma un compuesto intermedio, el cual posteriormente libera el último acetyl CoA incorporado, obteniéndose así el acetoacetato. La acetona es formada por descarboxilación y el ácido β -hidroxibutírico por reducción del acetoacetato, mientras que el isopropanol es formado por oxidación de la acetona (Cirio y Tebot, 2000).

Según Ndi bualonji y Godeau (1993) durante el primer día de ayuno son movilizados aminoácidos cetoformadores (triptófano, lisina, fenilalanina, tirosina y leucina) (Michaux y col, 1981), quienes en el hígado darán lugar a una pequeña proporción de CC en relación a los que se originan a partir de los AGNE (Demigné y col, 1988).

La formación de CC está regulada de dos maneras: metabólicamente y hormonalmente. La principal regulación metabólica resulta del equilibrio entre los metabolitos relacionados con el acetyl CoA. La glucosa, el glicerol, el propionato y el ácido glutámico permiten el consumo de la acetyl CoA e inhiben la formación de CC, por lo tanto son llamados glucoformadores. La disponibilidad de AGNE y su libre entrada al hígado también influye determinando la intensidad del proceso (Cal, 2007).

La regulación hormonal sobre la cetogénesis es principalmente indirecta; la insulina es anticetogénica por frenar la lipólisis y aumentar la utilización de glucosa, lo que permite un buen consumo de acetyl CoA en el ciclo de Krebs. Las hormonas con efecto cetogénico son aquéllas que aumentan la liberación de lípidos y como consecuencia incrementan los AGNE, tales como la adenocorticotrofina, los glucocorticoides, la somatotrofina y las catecolaminas (Michaux y col, 1981; Cirio y Tebot, 2000).

2. 9 Relación entre neoglucogénesis y cetogénesis

La NG y cetogénesis se hallan directamente relacionadas en la mayoría de los casos ya que el incremento de una vía lleva al incremento de la otra. El factor de unión entre NG y cetogénesis es el suministro de OAA al ciclo de Krebs. Cuando la demanda de glucosa es grande, el OAA sale de la mitocondria para producir glucosa ya que la vía de la NG a partir de este sustrato es citosólica. Si el OAA mitocondrial se agota, se compromete el inicio del ciclo de Krebs. Cuando esto ocurre las unidades de acetil-CoA se acumulan en la mitocondria y se condensan en CC, proceso que en si es intramitocondrial. De esta forma la NG, en virtud de sus requerimientos de OAA, promueve la cetogénesis. Todas las sustancias que tienden a aumentar el pool de OAA favorecen la oxidación del acetil-CoA hasta CO₂ y por lo tanto frenan la producción de CC (Cirio y Tebot, 2000).

La capacidad anticetogénica del propionato proveniente de la absorción ruminal se explica por ser el principal precursor neoglucogénico y con ello su habilidad para generar OAA que favorece la entrada de acetil-CoA al ciclo de Krebs (Cirio y Tebot, 2000).

Para que se instale un estado de cetosis, la producción de CC debe exceder la capacidad de su utilización por los tejidos periféricos (Cirio y Tebot, 2000).

2. 10 Regulación de la homeostasis energética

La regulación de la homeostasis energética incluye al mismo tiempo sustratos y hormonas. Los sustratos claves son la glucosa y los CC. Cuando disminuye la concentración de glucosa en sangre los ácidos grasos son movilizados y son transportados hacia el interior de las mitocondrias hepáticas. El metabolismo mitocondrial de los ácidos grasos fomenta la NG y la cetogénesis. Al mismo tiempo los CC y la glucosa suprimen la liberación de ácidos grasos desde el tejido adiposo en un sistema de retroalimentación negativo (Herdt y Emery, 1992; Harmeyer y Schlumbohm, 2006).

Las hormonas insulina y glucagón refuerzan este sistema de regulación de los sustratos. La movilización de ácidos grasos es inhibida en presencia de insulina y estimulada en su ausencia (Brockman y Laarveld, 1985). El glucagón aparece promoviendo el ingreso de ácidos grasos dentro de la mitocondria hepática y por tanto a la cetogénesis y la NG. Por lo tanto todo el proceso de la cetogénesis, desde la movilización grasa hasta el transporte de ácidos grasos hacia el interior de la mitocondria parece ser afectado por la acción opuesta de la insulina y del glucagón (Cal, 2007).

2. 11 Toxemia de la gestación

2. 11.1 Introducción

Una causa importante de muerte de ovejas en nuestro país es sin dudas la Toxemia de la Gestación (Cal Pereyra, 2007; Cal Pereyra y col, 2012). Si bien en otros países se la describe como una enfermedad asociada con gestaciones de dos o más corderos (East, 1983; Marteniuk y Herdt, 1988; Ford y col, 1990; Sargison y col, 1994; Scot, 1995; West, 1996; Andrews, 1997; Van Saun, 2000) en Uruguay ésta patología se puede presentar en ovejas con gestaciones simples, principalmente en inviernos rigurosos con grandes carencias nutricionales, provocando importantes pérdidas (Bonino y col, 1987; Cal, 2007).

La Toxemia de la Gestación es un trastorno metabólico que afecta a las ovejas preñadas durante el último tercio de la gestación, especialmente en las últimas seis semanas, como consecuencia de la incapacidad del organismo para mantener la homeostasis energética al enfrentarse, en esta etapa, a un BEN (Harmeyer y Schlumbohm, 2006; West, 1996).

2. 11.2 Etiología

La causa determinante de esta patología es una alteración del metabolismo energético siendo esta enfermedad esencialmente una forma severa de cetosis, caracterizada por una baja circulación de glucosa en sangre y altos niveles de CC circulantes (Andrews, 1997; Rook, 2000; Sorondo y Cirio, 2011). Esto último se produce por una excesiva síntesis de CC y una disminución en su utilización (Sigurdsson, 1988a). En ovejas en ayuno el BOHB representa entre el 70 y el 90% del total de CC que son producidos por el hígado (Brockman y Laarveld, 1985).

2. 11.3 Patogenia

Aunque la patogenia no es completamente conocida Sigurdsson (1988b) propone que el balance entre alimentación y requerimientos es el elemento central, a lo que Sargison y col (1994) agregan que la enfermedad es el resultado de un fallo en la energía proporcionada por la dieta y la proveniente de la NG para cubrir una demanda fetal incrementada de glucosa, lo que conduciría a las ovejas a un BEN.

Este BEN se debería fundamentalmente al incremento de los requerimientos de la unidad materno fetal (Marteniuk y Herdt, 1988; Herdt y Emery, 1992; Rook, 2000). El crecimiento del feto aumenta los requerimientos energéticos sobre los niveles de mantenimiento en aproximadamente un 150 % en ovejas con una gestación simple y hasta 200 % en ovejas gestando mellizos en la gestación avanzada (Rook, 2000).

A este aumento significativo de los requerimientos de energía se agrega una disminución de la ingesta de materia seca fundamentalmente a causa de una capacidad ruminal comprometida como consecuencia del aumento de volumen del útero en gestación (Gibbons, 1996; Andrews, 1997; Rook, 2000) y una disminución concomitante del apetito (Cirio y Tebot, 2000).

Por otra parte, el ingreso de glucosa al feto es relativamente insensible a la concentración sérica de insulina siendo así un tanto independiente de la regulación de la glucosa materna (Koenig y Contreras, 1984; Marteniuk y Herdt, 1988). Entonces, aunque la producción de glucosa materna disminuya los requerimientos del metabolito por parte del feto siguen siendo satisfechos. Este flujo unidireccional de glucosa hacia el feto ocurre a expensas de la homeostasis de la glucosa en la madre (Rook, 2000).

El metabolismo energético frecuentemente se ve alterado en esta situación. Las ovejas, así como los rumiantes en general, dependen casi exclusivamente de la glucosa formada en el hígado para mantener la glicemia, entrando el animal en un BEN (Herdt y Emery, 1992). En respuesta a este déficit energético el animal debe adaptar su metabolismo y para ello libera energía de los lugares de depósito y realizar cambios en el uso de sustratos. Herdt y Emery (1992) y Sigurdsson (1988b) proponen una teoría para explicar la patología de la toxemia de la gestación: “fracasan los mecanismos de regulación de la homeostasis energética en animales con un balance energético negativo, lo que resulta en una incapacidad para mantener la concentración de la glucosa en sangre y en la producción desenfrenada de cuerpos cetónicos”. Esto último se produce por una excesiva producción y/o por una disminución de su utilización (Herdt y Emery, 1992). La hipercetonemia presente en ovejas hipoglicémicas en gestación avanzada, contribuye significativamente a la reducción de la producción hepática de glucosa sanguínea en un 30 %, facilitando el desarrollo de la toxemia de la gestación (Schlumbohm y Harmeyer, 2004).

Al enfrentarse a un balance negativo de la glucosa el organismo intenta mantener la concentración de ella en sangre y el aporte a los tejidos periféricos, derivando el OAA y sus precursores, como el propionato, a la síntesis de glucosa, agotando de esta manera la disponibilidad de OAA (Bonino y col, 1987; González Montaña y Rejas López, 1995). La hipoglicemia estimula la NG a partir del catabolismo del tejido adiposo y de las proteínas, en base a la liberación de glucocorticoides (Bonino y col, 1987). De esta manera el animal moviliza tejido adiposo en forma de AGNE y glicerol; siendo el principal estímulo para la movilización de lípidos la baja concentración sérica de glucosa e insulina (Brockman y Laarveld, 1985; Chilliard, 1987; Herdt y Emery, 1992; Chilliard y col, 2000).

El glicerol sirve para la producción de glucosa vía NG en el hígado o para la resíntesis de TAG (Chilliard, 1987; Cirio y Tebot, 2000). Los AGNE captados por el hepatocito y activados a acil-CoA en el citosol pueden seguir dos caminos: la resíntesis de TAG (esterificación) y la β -oxidación. Mediante este último proceso intramitocondrial se produce acetil-CoA, la que puede tras unirse al OAA ingresar al ciclo de Krebs y generar energía o formar CC (Michaux y col, 1981; Chilliard, 1987; Contreras, 1998).

Cuando la cantidad de grasa movilizada excede la capacidad de oxidación del hígado, las moléculas de acetil-CoA no ingresan al ciclo de Krebs por insuficiencia de OAA (que estará disminuido al decrecer el propionato y la glucosa) y así el acetil-CoA excedente es el origen del importante aumento de los CC (Michaux y col, 1981; Bonino y col, 1987; González Montaña y Rejas López, 1995; Contreras, 1998; Cirio y Tebot, 2000). Más allá de esta abundancia de CC los tejidos fetales no son capaces de utilizarlos como fuente de energía (Heitmann y col, 1987).

En estas circunstancias el exceso de ácidos grasos que ingresan al hepatocito no se oxidan, tomando el camino de la reesterificación, dando origen a los TAG dentro de la célula hepática (Herdt, 1988). Los triglicéridos sintetizados en el hígado deben ser incorporados en macromoléculas llamadas lipoproteínas para ser secretados o en caso contrario son almacenados en el hepatocito bajo forma de gotas de grasa. La acumulación de estas gotas de grasa conduce al hígado graso, alterando su estructura y función (Reid, 1980; Koenig y Contreras, 1984; Herdt, 1988; Herdt y Emery, 1992; Burt, 2001).

El aumento desproporcionado de CC en sangre conduce a una acidosis metabólica, al comportarse los CC como ácidos fuertes ($pK \cong 4$). Asimismo el paso de estos CC ionizados a la orina promueven la eliminación de ciertos cationes (Na^+ , K^+ , Ca^{++}), con lo que determina una expoliación electrolítica, produciendo deshidratación, puede ayudar a una hipocalcemia y conducir a un fallo renal. El acetoacetato tiene un efecto directo sobre cerebro, provocando una disminución en el consumo cerebral de O_2 y síntomas neurológicas (Bonino y col, 1981; Michaux y col, 1981; Bonino y col, 1987; Marteniuk y Herdt, 1988). Otra causa de los signos nerviosos probablemente se deba a una encefalopatía hipoglicémica (Radosits y col, 2001).

Otra consecuencia del aumento de los CC es el paso de los mismos a la orina, provocando cetonuria y orina ácida. Sin embargo hay que tener presente que en la orina de los rumiantes normalmente se encuentran pequeñas cantidades de CC, en valores que oscilan de 10 a 50 mg/dl (Bonino y col, 1987).

2. 11.4 Diagnóstico subclínico

Duffield (2000) define a la cetosis subclínica como aquella situación caracterizada por la presencia de un excesivo nivel de CC circulando en ausencia de signos clínicos de cetosis.

La mayor parte de los procesos fisiológicos que tienen lugar en el animal, involucran el transporte de metabolitos en la sangre. Como consecuencia, se puede diagnosticar el estado nutricional del animal, a partir de los cambios que ocurren en la composición de la sangre. Las concentraciones de AGNE y de CC en sangre, son buenos indicadores de estado energético de ovejas en gestación (Russel, 1984). Los niveles sanguíneos del BHOB reflejan el balance entre la movilización grasa y la capacidad de utilizar los CC producidos (Gibbons, 1996). Teniendo en cuenta esto se establecieron los siguientes parámetros de BHOB en ovinos según el grado de subnutrición: valor normal de nutrición (0,71 mmol/l), subnutrición moderada (1,1 mmol/l) y subnutrición severa (1,6 mmol/l) (Russel y col, 1977).

Se ha demostrado que la evaluación de la glicemia, el BOHB y el cortisol sérico permiten delimitar y diagnosticar la toxemia de la gestación subclínica (Cal Pereyra y col, 2015a). La enfermedad subclínica puede ser detectada cuando la glicemia alcanza valores de $28,62 \pm 4,33$ mg/dl., presentando en ese momento una tasa de BOHB en sangre de $2,26 \pm 1,03$ mmol/l., alcanzándose estos valores a partir de las 48 horas de comenzado el ayuno (Cal Pereyra y col, 2015a).

Los parámetros sanguíneos reflejan cambios que ocurren en el corto plazo, con lo cual sus determinaciones permiten tomar medidas de manejo antes de que se manifiesten alteraciones en la producción (Orcasberro, 1985).

2.11.5 Diagnóstico clínico en laboratorio

Para el diagnóstico clínico de toxemia de la gestación a través del laboratorio se pueden utilizar tanto muestras sanguíneas como de orina.

La eliminación de los CC ocurre por vía pulmonar, por la leche y por la orina ya que son moléculas de tamaño pequeño, solubles, volátiles y muy difusibles.

En ovinos el BHOB se determina en suero por un método enzimático colorimétrico, utilizando para ello los Kits comerciales Ranbut® (Randox Laboratories Ltd.). La lectura se realiza a 330 nm, y a una temperatura de 37° C, en un colorímetro digital (Cal Pereyra, 2007). El costo de estos Kits es muy elevado, es necesario obtener las muestras de sangre, luego el suero, acondicionarlas debidamente congeladas para su posterior procesamiento en Laboratorio.

Varios autores proponen que el diagnóstico de toxemia de la gestación clínica se realiza cuando la concentración de BOHB sérico está por encima de los 3,0 mmol/l (54,05 mg/dl), aunque comúnmente supera los 5,0 mmol/l (90,09 mg/dl) (Marteniuk y Herdt, 1988; Cantley y col, 1991; Scott y Woodman, 1993; Sargison y col, 1994; Scott, 1995a; Scott y col, 1995b; West, 1996; Andrews, 1997). Pethic y Lindsay (1982) sugieren que el valor diagnóstico del BOHB es de 2 mmol/l (36,03 mg/dl).

Para determinar los CC en la orina existen, una serie de pruebas diagnósticas semicuantitativas basadas en reacciones colorimétricas. Sin embargo no hay que dejar de tener en cuenta que la presencia de pequeñas cantidades de CC en la orina de los rumiantes es considerada fisiológica (Bonino y col, 1987; Cirio y Tebot, 2000; Radostits y col, 2001).

La prueba semicuantitativa de Rothera ha sido descrita por algunos autores para la valoración de CC urinarios (Koenig y Contreras, 1984; Sienna y col, 1984; Bonino y col, 1987). La composición del reactivo de Rothera es 60 partes de sulfato de amonio, 60 partes de carbonato de sodio y 2 partes de nitroprusiato de sodio, teniendo este reactivo una sensibilidad estimada de 10 mg/dl. Se depositan tres o cuatro gotas del plasma a analizar sobre una cantidad suficiente de reactivo, procediéndose a su lectura a los 3 minutos. Se considera positiva la aparición de una coloración púrpura o violácea, en cuyo caso se realizan diluciones crecientes en agua destilada hasta la desaparición de dicho color. La concentración de CC se estima a partir de la última dilución positiva (Bonino y col, 1987). En razón de la cetonuria fisiológica de los ovinos se considera positiva la reacción cuando se ha realizado en orina diluida al octavo (Sienna y col, 1984).

También existe como diagnóstico rápido con tiras reactivas para muestras de orina que dan una valoración semicuantitativa de los niveles de CC urinarios (Koenig y Contreras, 1984; Sienra y col, 1984; González Montaña, 2003).

2. 12 Cetoacidosis diabética en humanos

En humanos la cetoacidosis diabética (CAD) es una complicación aguda de la diabetes Mellitus, la cual se asocia con una alta morbilidad, presentando asimismo un elevado riesgo de muerte (Byrne y col, 2000; Rodríguez-Merchán y col, 2011). En esta especie el BHOB es también el principal cuerpo cetónico producido en la CAD (Wallace and Matthews, 2004). En los últimos años se ha logrado el diagnóstico rápido y preciso de este cuerpo cetónico en sangre capilar mediante el uso de tiras reactivas y un dispositivo electroquímico (Byrne y col, 2000; Wallace y col, 2001).

El laboratorio Abbott comenzó a comercializar en nuestro mercado las tiras reactivas FreeStyle Optium® para la determinación de BHOB en humanos. Estas tiras de prueba están concebidas para medir cuantitativamente el BHOB en sangre capilar entera de la yema del dedo pudiendo también ser usadas con muestras de sangre entera venosa.

El principio de la prueba radica en que cuando se aplica la muestra de sangre a la tira de prueba, el BHOB presente en la sangre reacciona con las sustancias químicas de la tira y produce una corriente eléctrica pequeña. Esta corriente se mide y el medidor muestra luego el resultado. La magnitud de la corriente depende de la cantidad de BHOB que hay en la muestra de sangre.

Las pruebas de precisión muestran que los resultados generalmente no varían en más del 3,1% al 3,8% y los estudios de exactitud realizados sobre el dispositivo demostraron que los sistemas de FreeStyle Optium®, son comparables al método de referencia de laboratorio.

Estos dispositivos electroquímicos pueden llegar a representar una alternativa para la determinación de BHOB en ovinos, al ser más económicas y un método de determinación rápido y a campo. Sin embargo no se han reportado trabajos que validen su uso en esta especie.

3 HIPÓTESIS

La utilización de un dispositivo electroquímico de uso humano permitiría la determinación a campo de β - hidroxibutirato en sangre de ovinos obteniendo resultados válidos al igual que los encontrados mediante el método enzimático colorimétrico de laboratorio.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Evaluar un dispositivo electroquímico para la determinación a campo de β -hidroxibutirato en sangre de ovinos.

4.2 Objetivos específicos:

- 1) Determinar los valores de β -hidroxibutirato en sangre de ovejas adultas vacías obtenido con un dispositivo electroquímico.
- 2) Determinar los valores de β -hidroxibutirato en sangre de ovejas adultas en los últimos 25 días de la gestación obtenido con un dispositivo electroquímico.
- 3) Determinar los valores de β -hidroxibutirato en sangre de ovejas adultas con Toxemia de la gestación subclínica gestando un solo cordero obtenido con un dispositivo electroquímico.
- 4) Determinar los valores de β -hidroxibutirato en sangre de ovejas adultas con Toxemia de la gestación subclínica gestando mellizos obtenido con un dispositivo electroquímico.
- 5) Validar los resultados de la determinación de β -hidroxibutirato en sangre de ovejas obtenido con un dispositivo electroquímico con los obtenidos mediante un método enzimático colorimétrico de laboratorio.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5. 1 Lugar

El estudio se realizó en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria, Libertad, Departamento de San José durante el año 2016. Dicho campo se encuentra situado en el sur del departamento, en la 4° Sección Judicial, sobre la Ruta Nacional N°1, km 42,500. Ocupa una superficie de 324 hás.

El índice de Productividad CONEAT promedio es de 210, teniendo el 66% de la superficie un índice de 236 y el 30% de la misma un índice de 184.

5. 2 Diseño experimental

Este ensayo experimental fue aprobado por la CEUA y la Facultad de Veterinaria.

5. 2.1 Animales

Se utilizaron 70 ovejas Corriedale adultas, entre 4 y 6 años, identificadas por medio de caravanas numeradas y tres carneros de la misma raza de 4 años. Estas fueron seleccionadas de un total de 100 ovejas, de acuerdo a su condición corporal, al estado de la dentadura y de las pezuñas de manera de homogenizar la muestra. Se seleccionaron animales con un peso homogéneo y una condición corporal por encima de 2,5, valorados en un rango de 1 a 5 (Manazza, 2006).

Se sincronizaron los celos de las 70 ovejas con esponjas intravaginales conteniendo 160 mg de progesterona (Cronipres® CO, Biogénesis-Bagó) durante 12 días (Romano y col, 1993). Una vez retiradas las esponjas se realizó el servicio por monta natural usando 3 carneros provistos con arneses marcadores. El control de las montas se realizó durante cuatro días, registrándose el día de la monta como el día cero (0) de la gestación. Entre los días 30 y 45 tras retirar los carneros, se realizó el diagnóstico de gestación por ultrasonografía transrectal (Buckrell, 1988), seleccionando de esta forma 21 ovejas gestando un solo feto, 9 gestando mellizos y 10 vacías.

5. 2.2 Diseño del protocolo

Posteriormente a la cubrición, las 40 ovejas seleccionadas pasaron a alimentarse en un potrero con pastura natural. En el día 125 de gestación los animales se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos (A, B, C y D). Teniendo en cuenta que la duración de la gestación de las ovejas Corriedale es de 147.9 ± 1.9 (Benech, 2007), se aplicó el siguiente protocolo:

Grupo A (n=11): a partir del día 125 de la gestación 11 ovejas gestando un cordero único fueron encerradas en corrales techados y con piso de hormigón. Durante el encierro fueron sometidas a una restricción alimentaria, con libre acceso al agua. Cada oveja fue alimentada con 0,8 Kg / día de heno de alfalfa (equivalente al 50 %

de las necesidades diarias, 1.79 Mcal de EM) (AFRC, 1993). Se consideró que los animales entraron en Toxemia de la gestación subclínica, cuando la glicemia alcanzó valores considerados de riesgo ($28,62 \pm 4,33$ mg/dl), valores séricos que permiten diagnosticar esta patología (Cal Pereyra y col, 2015a). A las 72 horas de alcanzados estos valores, los animales fueron retirados de la restricción alimenticia y pasaron a alimentarse en el potrero con pastura natural.

Grupo B (n=9): a partir del día 125 de la gestación 9 ovejas gestando mellizos fueron encerradas en corrales techados y con piso de hormigón. Durante el encierro fueron sometidas a una restricción alimentaria, con libre acceso al agua. Cada oveja fue alimentada con 0,8 Kg / día de heno de alfalfa (equivalente al 50 % de las necesidades diarias, 1.79 Mcal de EM) (AFRC, 1993). Se consideró que los animales entraron en Toxemia de la gestación subclínica, cuando la glicemia alcanzó valores considerados de riesgo ($28,62 \pm 4,33$ mg/dl), valores séricos que permiten diagnosticar esta patología (Cal Pereyra y col, 2015a). A las 72 horas de alcanzados estos valores, los animales fueron retirados de la restricción alimenticia y pasaron a alimentarse en el potrero con pastura natural.

Grupo C (n=10): las ovejas de este grupo (gestando un solo cordero) continuaron alimentándose libremente durante todo el ensayo.

Grupo D (n=10): Las ovejas vacías continuaron alimentándose libremente durante todo el ensayo.

5.2.3 Determinaciones en sangre

Las muestras de sangre de todas las ovejas se obtuvieron por punción de la vena yugular con jeringas de 10 ml y agujas 18G.

5. 2.3.1 Determinación de glucosa

A partir del comienzo del encierro (comienzo de la restricción alimenticia), las ovejas de los grupos A y B se le realizó una extracción de sangre cada 24 horas hasta 72 horas posteriores a que la que la glicemia alcanzó valores considerados de riesgo ($28,62 \pm 4,33$ mg/dl). La sangre para determinación de glicemia se colectó en tubos con fluoruro de sodio y EDTA. Las muestras se centrifugaron inmediatamente y almacenaron congeladas a -20° C en tubos Eppendorf debidamente rotulados e identificados hasta el procesamiento de laboratorio por un método enzimático colorimétrico.

5. 2.3.2 Determinación de β -hidroxibutirato

Se realizó una extracción de sangre a todas las ovejas a los 125 y 145 días de gestación y a las 72 horas de producido el parto para valorar la concentración sérica de BOHB en el laboratorio. Al obtener la muestra de sangre se determinó a campo la concentración de este cuerpo cetónico utilizando tiras reactivas FreeStyle Optium[®], depositándose el resto de la sangre en tubos de ensayo secos. Las muestras se centrifugaron inmediatamente y almacenaron congeladas a -20° C en tubos Eppendorf debidamente rotulados e identificados hasta el procesamiento de laboratorio por un método enzimático colorimétrico.

5. 3 Análisis de las muestras

5. 3.1 En el laboratorio

Las muestras de glicemia y BOHB se analizaron en el Laboratorio de Fisiopatología del Departamento de Patología de la Facultad de Veterinaria.

La glicemia se determinó en el suero sanguíneo por un método enzimático colorimétrico, utilizando para ello los Kits comerciales Glucose Liquicolor® (Human). La glucosa presente se determina tras la oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa. Esta reacción forma peróxido de hidrógeno, el cual reacciona bajo la catálisis de peroxidasa con fenol y 4-aminofenazona, formando un complejo rojo violeta usando la quinoneimina como indicador. Se midió la absorbancia a 500 nm, y a una temperatura de 37 °C, en un colorímetro digital HUMALYSER JUNIOR.

El BOHB se determinó en suero sanguíneo por un método enzimático colorimétrico, utilizando para ello los Kits comerciales Ranbut® (Randox Laboratories Ltd.). Este método se basa en la oxidación del D-3-hidroxiacetato por medio de la enzima 3-hidroxiacetato deshidrogenasa. Concomitantemente con esta oxidación el cofactor NAD⁺ es reducido a NADH. Esta reacción se asocia con un cambio de la absorbancia que es directamente proporcional a la concentración de D-3-hidroxiacetato. La lectura se realizó a 330 nm, a una temperatura de 37 °C, en un colorímetro digital HUMALYSER Junior.

5. 3.2 A campo

El BOHB se determinó utilizando tiras reactivas FreeStyle Optium® Neo® (Laboratorio Abbott), las cuales fueron leídas en un dispositivo electroquímico. El medidor muestra el resultado en 10 segundos y puede medir niveles de BOHB comprendidos entre 0,0 a 8,0 mmol/l.

El principio de la prueba radica en que cuando se aplica la muestra de sangre a la tira de prueba, el BHOB presente en la sangre reacciona con las sustancias químicas de la tira y produce una corriente eléctrica pequeña. Esta corriente se mide y el medidor muestra luego el resultado. La magnitud de la corriente depende de la cantidad de BHOB que hay en la muestra de sangre.

5. 4 Análisis estadístico

Se utilizó el método de Bland & Altman (Bland & Altman, 1986) expresándose los resultados como las medias de las diferencias para comparar y analizar los resultados obtenidos de la lectura del dispositivo electroquímico con los de la medida de referencia (lectura del fotolorímetro) calculada para cada muestra. Asimismo se realizó un análisis de coeficiente de correlación de concordancia (Lin, 1989-2000) para los datos obtenidos por ambos métodos. Para medir el nivel de acuerdo entre los resultados obtenidos por ambos métodos analíticos se utilizó el estadístico Kappa (Dohoo y col, 2007). Se utilizó el paquete estadístico Stata.

6 RESULTADOS

Al día 125 de la gestación, momento de comenzar la restricción alimenticia, no se encontró diferencia significativa en la glicemia en las ovejas de los grupos A y B, presentando en ese momento valores medios de $52,6 \pm 4,46$ y $48,38 \pm 6,6$ mg/dl, respectivamente.

La evolución de los valores séricos de este metabolito para estos dos grupos se muestra en la Figura 1. A partir del día 125 de la gestación se observa una disminución de la glicemia en los dos grupos experimentales, alcanzando los valores considerados de riesgo ($28,62 \pm 4,33$ mg/dl), los cuales definen la toxemia de la gestación subclínica, a los 16 días de comenzada la restricción de alimentos en los dos grupos experimentales, presentando en ese momento valores medios de $28,67 \pm 6,64$ y $27,71 \pm 5,62$ mg/dl en los grupos A y B respectivamente.

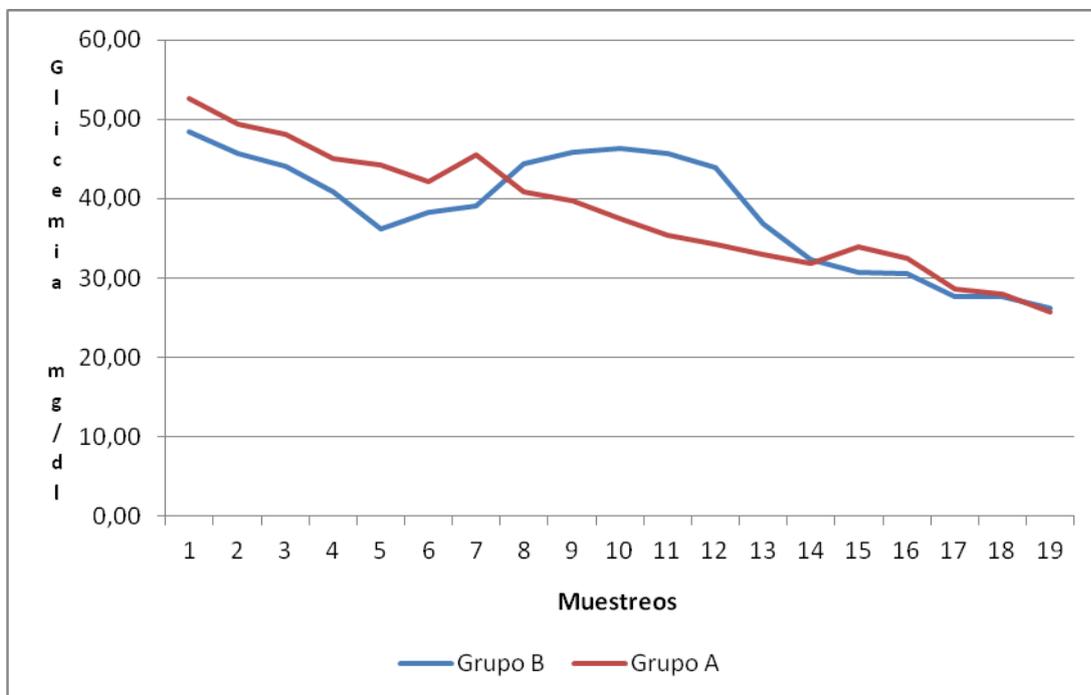


Figura 1. Evolución de la Glicemia

Evolución de los valores séricos de glicemia (expresada en mg/dl) obtenidos cada 24 horas, desde el comienzo de la restricción alimenticia al día 125 de la gestación (muestreo 1). Grupo A (n=11): ovejas con gestación única con restricción alimenticia a partir del día 125 de la gestación y Grupo B (n=9): ovejas gestando mellizos con restricción alimenticia a partir del día 125 de la gestación.

Los valores séricos de BOHB obtenidos al día 125 de la gestación, momento de comenzar la restricción de alimentos, de las ovejas de los cuatro grupos experimentales se muestran en la Tabla 1. Se presentan los valores de este cuerpo cetónico obtenidos por un método enzimático colorimétrico en Laboratorio (Lab) y los obtenidos a campo utilizando tiras reactivas FreeStyle Optium® Neo® (Campo).

Tabla 1. Valores séricos de BOHB al día 125 de la gestación

Muestras Día 125 gestación	Grupo A		Grupo B		Grupo C		Grupo D	
	Lab.	Campo	Lab.	Campo	Lab.	Campo	Lab.	Campo
1	0.88	0.6	0.94	0.9	0.4	0.4	0.48	0.4
2	0.77	0.6	0.41	0.3	0.92	0.6	0.20	0.2
3	1.12	0.7	0.97	0.7	0.6	0.4	0.29	0.2
4	1.28	0.7	0.33	0.3	0.39	0.3	0.65	0.4
5	0.45	0.4	1.28	0.4		0.6	0.55	0.4
6	0.87	0.6	0.65	0.6	0.46	0.4	0.31	0.2
7	0.35	0.4	0.37	0.3	0.65	0.4	0.39	0.2
8	0.71	0.5	0.87	0.7	0.86	0.6		0.4
9	0.99	0.8	1.32	0.6	0.43	0.7		0.2
10	0.48				0.77	0.6	0.37	0.1
11	0.99							
X	0.81	0.59	0.76	0.53	0.61	0.50	0.41	0.30
DS (±)	0.29	0.14	0.43	0.22	0.20	0.13	0.15	0.11

Valores de BOHB sérico (expresados en mmol/l) obtenidos al día 125 de la gestación, por método enzimático colorimétrico (Lab) y utilizando tiras reactivas FreeStyle Optium® Neo® (Campo) expresados en mmol/l. Grupo A (n=11): ovejas con gestación única con restricción alimenticia a partir del día 125 de la gestación; Grupo B (n=9): ovejas gestando mellizos con restricción alimenticia a partir del día 125 de la gestación; Grupo C (n=10): ovejas con gestación única sin restricción alimenticia y Grupo D (n=10): ovejas vacías.

Los valores séricos de BOHB obtenidos de las ovejas de los cuatro grupos experimentales al día 145 de la gestación se muestran en la Tabla 2. Se presentan los valores de este cuerpo cetónico obtenidos por un método enzimático colorimétrico en Laboratorio (Lab) y los obtenidos a campo utilizando tiras reactivas FreeStyle Optium® Neo® (Campo).

Tabla 2. Valores séricos de BOHB al día 145 de la gestación

Muestras Día 145 gestación	Grupo A		Grupo B		Grupo C		Grupo D	
	Lab.	Campo	Lab.	Campo	Lab.	Campo	Lab.	Campo
1	2.54	2.8	3.07	1.9	0.78	0.6	0.88	0.6
2	1.68	1.0	1.63	1.8	0.68	0.4	0.22	0.3
3		1.4	0.73	0.4	0.81	0.6	0.33	0.1
4	1.46	0.4	0.26	0.2	0.7	0.6	0.3	0.4
5	0.43	0.4	0.86	0.8	0.87	0.9	0.69	0.5
6	0.73	0.3			0.36	0.4	0.3	0.4
7			0.24	0.2	0.61	0.4	0.43	0.3
8		0.9	4.96	3.9	1.44	0.8	0.20	0.2
9	1.84	1.1	1.8	1.4	0.4	0.3	0.37	0.3
10	0.22	0.4			0.76	0.6	0.5	0.3
11	0.99	0.7						
X	1.24	0.94	1.69	1.33	0.74	0.56	0.42	0.34
DS (±)	0.78	0.75	1.62	1.25	0.30	0.19	0.22	0.14

Valores de BOHB sérico (expresados en mmol/l) obtenidos al día 145 de la gestación, por método enzimático colorimétrico (Lab.) y utilizando tiras reactivas FreeStyle Optium® Neo® (Campo) expresados en mmol/l. Grupo A (n=11): ovejas con gestación única con restricción alimenticia a partir del día 125 de la gestación; Grupo B (n=9): ovejas gestando mellizos con restricción alimenticia a partir del día 125 de la gestación; Grupo C (n=10): ovejas con gestación única sin restricción alimenticia y Grupo D (n=10): ovejas vacías.

Los valores séricos de BOHB obtenidos de las ovejas de los cuatro grupos experimentales a las 72 horas de producido el parto se muestran en la Tabla 3. Se presentan los valores de este cuerpo cetónico obtenidos por un método enzimático colorimétrico en Laboratorio (Lab) y los obtenidos a campo utilizando tiras reactivas FreeStyle Optium® Neo® (Campo).

Tabla 3. Valores séricos de BOHB a las 72 horas posparto

Muestras 72 horas pos parto	Grupo A		Grupo B		Grupo C		Grupo D	
	Lab.	Campo	Lab.	Campo	Lab.	Campo	Lab.	Campo
1	0.68	0.6	0.53	0.4	1.86	1.2	0.74	0.6
2	0.19	0.1	2.02	1.3		0.7	0.55	0.4
3		0.7	1.1	0.8	0.2	0.3	0.34	0.2
4	1.25	1.1			1.4	1.0	0.42	0.3
5	0.62	0.7	0.92	0.7		0.8	0.53	0.4
6	0.78	0.6			0.59	0.6	0.53	0.3
7	0.49	0.6				1.3	0.44	0.4
8	1.22	0.8		0.4	0.58	0.3	0.3	0.2
9	0.59	0.5	2.13	1.7	1.1	0.7	0.48	0.4
10	0.68	0.6			1.12	0.8	0.31	0.2
11		0.8						
X	0.72	0.74	1.34	0.88	0.98	0.77	0.46	0.34
DS (±)	0.34	0.20	0.70	0.52	0.56	0.33	0.13	0.13

Valores de BOHB sérico (expresados en mmol/l) obtenidos a las 72 horas pos parto, por método enzimático colorimétrico (Lab.) y utilizando tiras reactivas FreeStyle Optium® Neo® (Campo) expresados en mmol/l. Grupo A (n=11): ovejas con gestación única con restricción alimenticia a partir del día 125 de la gestación; Grupo B (n=9): ovejas gestando mellizos con restricción alimenticia a partir del día 125 de la gestación; Grupo C (n=10): ovejas con gestación única sin restricción alimenticia y Grupo D (n=10): ovejas vacías.

En la figura 2, se muestra el coeficiente de concordancia para todos los valores de BOHB obtenidos por ambos métodos analíticos (laboratorio y campo). Se observa que la pendiente de la línea trazada por los datos obtenidos es superior a 45° con respecto a la línea de perfecta concordancia. Se observa asimismo que para los valores mayores a 2 mmol/l ésta pendiente se acentúa, lo que demuestra una menor concordancia entre ambos métodos.

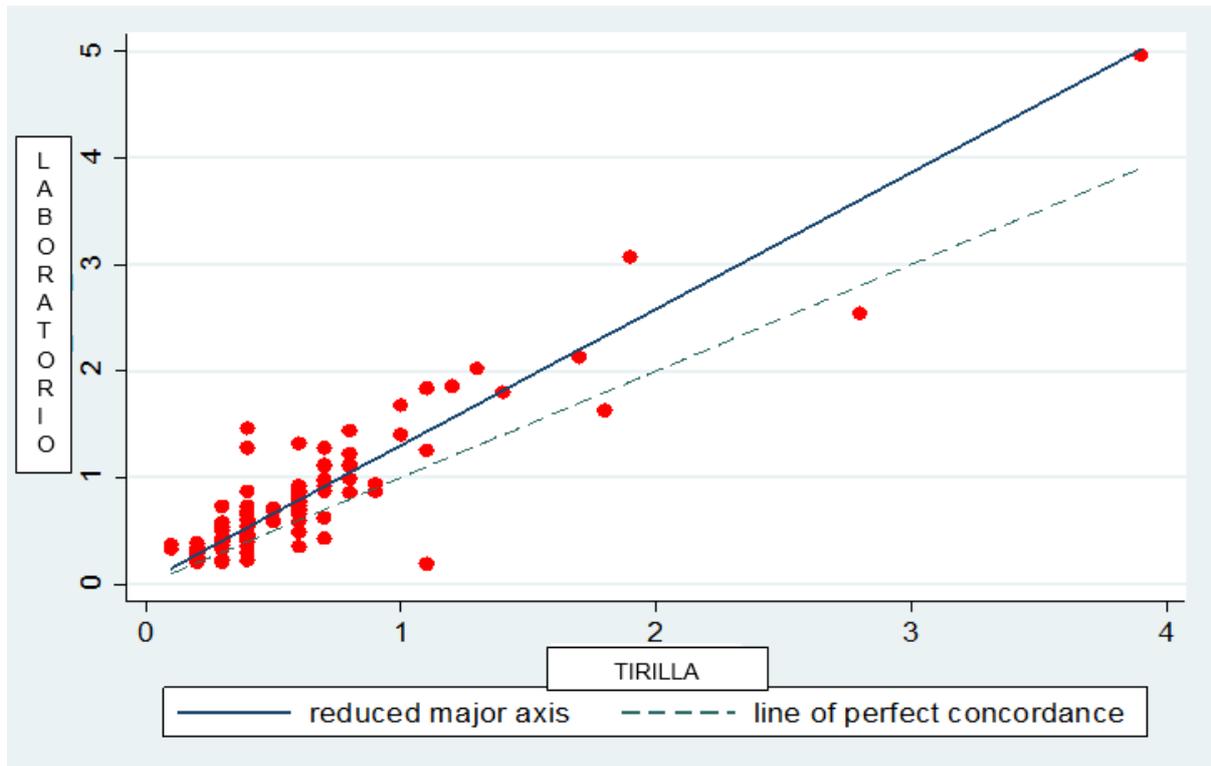


Figura 2. Coeficiente de concordancia entre métodos

Valores séricos de BOHB (expresada en mmol/l). * corresponden a valores de laboratorio, ● Corresponden a valores de tirilla. La línea continua corresponde al mejor ajuste entre los datos obtenidos por los dos métodos analíticos, la línea punteada corresponde al valor teórico de perfecta concordancia.

En la figura 3, se observa que la media de las diferencias obtenidas por los métodos de Laboratorio y tirilla, se encuentra por encima del acuerdo promedio perfecto, lo que demuestra que los valores de BOHB obtenidos por el método de laboratorio son superiores a los obtenidos por el método electroquímico (tirilla).

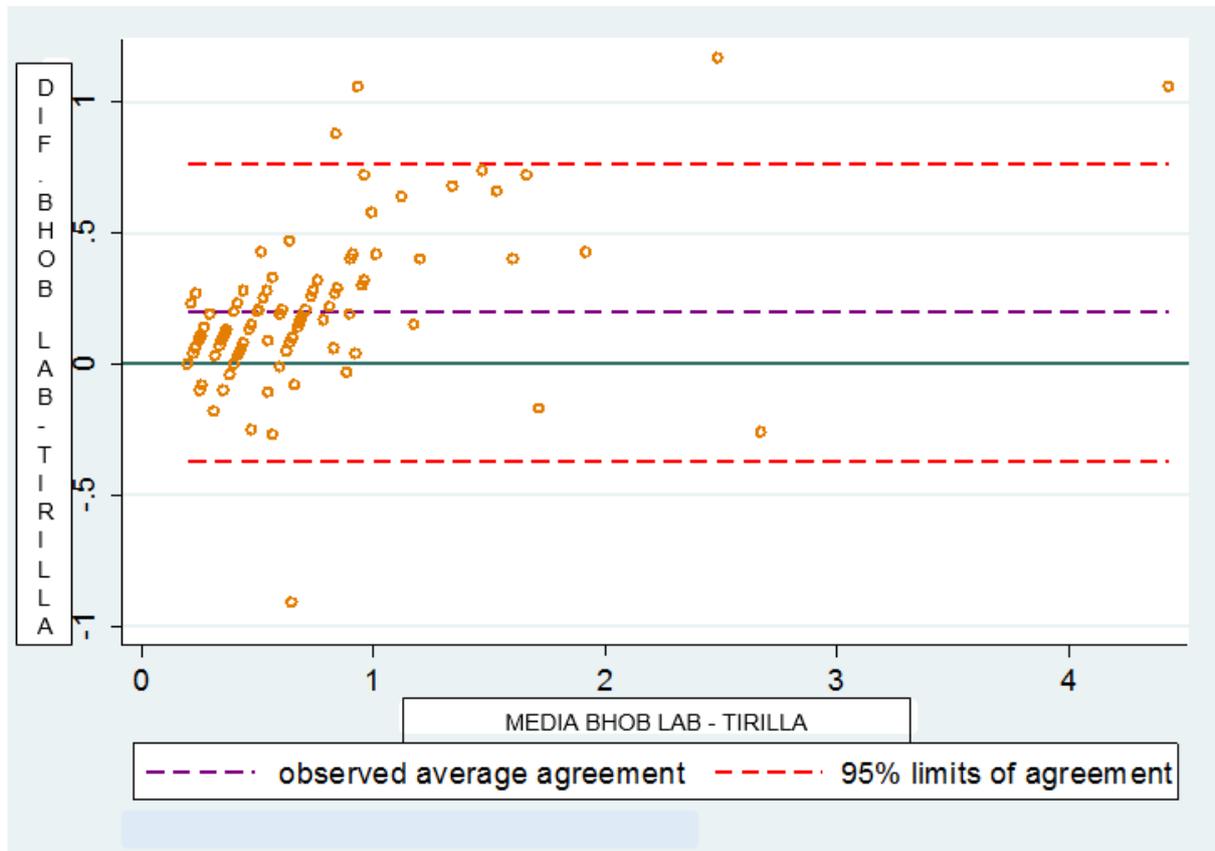


Figura 3. Diferencias de los resultados de BHOB entre métodos

Diferencias entre los resultados de BHOB expresadas en mmol/l obtenidos entre el método de Laboratorio y los obtenidos a campo analizadas por el método de Bland & Altman (1986). La línea continua corresponde al acuerdo promedio perfecto, la línea punteada azul corresponde al acuerdo promedio observado, en tanto las líneas punteadas rojas corresponden al desvío estándar de las diferencias entre los datos obtenidos por ambos métodos.

Del análisis de todos los datos a través del estadístico Kappa, se determina que existe un acuerdo moderado (0.5591) entre ambos métodos.

7 DISCUSIÓN

Los valores de glucosa en sangre de las ovejas de los dos grupos experimentales al día 125 de la gestación (momento previo a que fueran sometidas a una restricción alimenticia) (A= $52,6 \pm 4,46$ y B= $48,38 \pm 6,67$ mg/dl) se encontraron entre los valores admitidos como normales para ovejas alimentadas al final de la gestación. Contreras y col (1990) encontraron que la glicemia de ovejas gestando un solo feto fue de $61,08 \pm 9,1$ mg/dl y de $55,13 \pm 13,33$ mg/dl en ovejas gestando mellizos. Cal Pereyra y col (2015a) y Da Silva y col (2016) reportaron valores de $54,77 \pm 9,6$ y $53,26 \pm 5,45$ mg/dl respectivamente, en ovejas Corriedale gestando un solo cordero al día 130 de la gestación, en tanto que Sigurdsson (1988a) reportó un valor promedio de glicemia de $51,82 \pm 10,14$ mg/dl en ovejas gestando uno o dos corderos al día 130 de la gestación.

La disminución de los niveles de glucosa en sangre en los animales sometidos a una restricción alimenticia debido a períodos cortos de inanición o de restricción alimenticia es ampliamente reportada (Sienra y col.1984, Sigurdsson 1988a, West 1996; Cal Pereyra y col, 2015a; Cal Pereyra y col 2015b). El balance negativo entre la ingesta de energía y el consumo sería el factor clave para una caída importante de la glucosa en la sangre. La creciente demanda de glucosa durante la gestación tardía puede explicar fácilmente los bajos niveles de glucosa de las ovejas gestadas (Herdt y Emery, 1992; Rook 2000; Cal Pereyra y col, 2015a). La demanda energética aumenta en un 150% en ovejas con un solo feto y hasta aproximadamente un 200% en ovejas con gemelos (Rook 2000).

Considerando los valores de glucemia, en el momento de retirar las ovejas de la restricción de alimentos y el hecho de que no hubo signos clínicos, es razonable suponer que estos animales fueron afectados por toxemia de la gestación subclínica.

Nuestros resultados demostraron que los valores obtenidos por el método de laboratorio son superiores a los obtenidos por método electroquímico, resultados similares a los reportados por Kupczynski y col (2008), quienes realizaron un ensayo similar al nuestro pero en bovinos.

Del análisis estadístico de todos los datos se determinó que existe un acuerdo moderado (0.5591) entre ambos métodos (Dohoo y col, 2007); sin embargo al comparar los métodos de laboratorio y electroquímico en nuestro ensayo se demuestra que cuando los valores de BOHB son superiores a los 2 mmol/l disminuye la concordancia entre los métodos analíticos comparados. Byrne y col (2000), demostraron que existe concordancia entre los valores de este cuerpo cetónico obtenidos por el método de Laboratorio y un dispositivo electroquímico, sin embargo estos autores consideraron valores de BOHB hasta 2 mmol/l.

En nuestro ensayo solo obtuvimos 5 muestras con concentraciones de BOHB superiores a 2 mmol/l, lo cual no permitió realizar un análisis estadístico para valores superiores de este cuerpo cetónico.

8 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a campo mediante la utilización del dispositivo electroquímico para la determinación de β -hidroxibutirato en sangre de ovejas vacías, así como en ovinos con toxemia subclínica gestando un solo cordero o mellizos, mostraron un acuerdo moderado con los obtenidos a través del método enzimático colorimétrico de laboratorio para valores menores a 2mmol/l.

Con el fin de establecer la concordancia entre ambos métodos, para concentraciones de BOHB superiores a 2 mmol/l, sería necesario obtener un mayor número de muestras que permita su análisis estadístico.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. AFRC. Agricultural and Food Research Council (1993). Energy and Protein Requirements of Ruminants. An Advisory manual prepared by the Technical Committee on Responses to Nutrients. Wallingford, CAB International; p 1- 8.
2. Andrews A (1997). Pregnancy toxemia in the ewe. In Practice, 19 (6): 306-312.
3. Bell A W (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. J Anim Sci, 73: 2804-2819.
4. Benech Gulla, A (2007). Evaluación del ayuno como posible método de inducción del parto en el ganado ovino. Tesis doctoral. Universidad de León, León, 155p.
5. Bergman N E, Roe W E, Kon W (1966). Quantitative aspects of propionate metabolism and gluconeogenesis in sheep. Am. J. Physiol, 211: 793-799.
6. Bergman N E (1971). Hyperketonemia-ketogenesis and ketone body metabolism. J. Dairy Sci, 54: 936-948.
7. Bland JM, Altman DG (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet, 1(8476): 307-310.
8. Bonino J, Sienna R, Sorondo, M L (1981) Toxemia de la preñez. Terceras Jornadas Veterinarias de Ovinos, Tacuarembó, Uruguay, p 1-21.
9. Bonino J, Sienna R, Sorondo M L (1987). Enfermedades causadas por trastornos metabólicos: toxemia de la preñez. En: Bonino J, Durán del Campo A, Mari J. Enfermedades de los lanares II. Montevideo, Hemisferio Sur, V2, p 239-265.
10. Borreli P. (2001). Producción Animal sobre pastizales naturales. En: Borreli P, Oliva, G. Ganadería Sustentable en la Patagonia Austral. Buenos Aires, INTA, p 126-160.
11. Brockman R P, Laarveld B (1985). Effects of insulin on net hepatic metabolism of acetate and β -hidroxybutyrate in sheep (ovis aries). Comp Biochem Physiol, 81 (A2): 255-257.
12. Buckrell B C (1988). Application of ultrasonography in reproduction in sheep and goats. Theriogenology, 29: 11-20.
13. Burt A D (2001). Steatosis and Steatohepatitis. Curr Diag Pathol, 7: 141-147.
14. Byrne H, Tieszen, K, Hollis, Dornan T, New J (2000). Evaluation of an Electrochemical Sensor for measuring blood Ketones. Diabetes Care, 23 (4): 500-503.

15. Cal Pereyra L (2007). Inducción experimental de Toxemia de la Gestación Ovina. Aplicación a la explotación ovina en Uruguay. Tesis Doctoral. Universidad de León, León, España, 131 p.
16. Cal Pereyra L, Acosta Dibarrat J, Benech A, Da Silva S, Martín A, González Montaña JR (2012). Ewe pregnancy toxemia. Review. *Rev Mex Cienc Pecu*, 3(2): 247-264.
17. Cal Pereyra L, Benech A, González-Montaña JR, Acosta J, Da Silva S, Martín A. (2015a). Changes detection in the metabolic profile of pregnant ewes to an acute feed restriction in the late gestation. *New Zealand Vet. J.*, 63(3): 141–146.
18. Cal Pereyra L, González Montaña JR, Benech A, Acosta J, Martín MJ, Perini S, Abreu MC, Da Silva S; Rodríguez Gamarra P (2015b). Evaluation of three therapeutic alternatives for the early treatment of ovine pregnancy toxemia, *Irish Vet. J.*, 68 (25): 1-7.
19. Cantley C E L, Ford C M, Heath M F (1991). Serum fructosamine in ovine pregnancy toxemia: a possible prognostic index. *Vet. Rec.*, 128: 525-526.
20. Charamelo S., Grau R. (2013). Evaluación del ácido-2-metil-2-fenoxi-propionico como alternativa terapéutica en el tratamiento de hígado graso en la toxemia de la gestación clínica ovina. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria. UdelaR. 28 p.
21. Chilliard Y (1987). Variations qualitatives et metabolisme des lipides dans les tissus adipeux et le foie au cours du cycle gestation-lactation chez la brebis et la vache. *Reprod Nutr Develop*, 27: 327-398.
22. Chilliard Y, Ferlay A, Faulconnier Y, Bonnet M, Rouel J, Bocquier F (2000). Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proc. Nutr. Soc.*, 59: 127-134.
23. Cirio A, Tebot I. (2000) Fisiología Metabólica de los Ruminantes. Montevideo, Facultad de Veterinaria, 146 p.
24. Contreras P A, Möller I, Wittwer F, Tadich N (1990). Concentraciones sanguíneas de glucosa, colesterol, cuerpos cetónicos y actividad de aspartato aminotransferasa en ovejas con gestación única y gemelar en pastoreo rotacional intensivo. *Arch Med Vet*, 22 (1): 65-69.
25. Contreras P A (1998). Síndrome de movilización grasa en vacas lecheras al inicio de la lactancia y sus efectos en salud y producción de los rebaños. *Arch Med Vet* 30(2):1-7.
26. Da Silva S, Cal Pereyra L, Benech A, Acosta-Dibarrat J, Martin M J, Abreu M, Perini S, Gonzalez Montaña JR (2016). Evaluation of a fibrate, specific stimulant of PPAR α , as a therapeutic alternative to the clinic ovine pregnancy toxemia. *J. Vet. Pharmacol. Ther* 39 (5): 497-503.

27. Demigné C, Yacoub C, Morand C, Remesy C (1988). Les orientations du métabolisme intermédiaire chez les ruminants. *Reprod Nutr Develop*, 28 (1): 1-17.
28. Díez Prieto I, Cano Rábano M J, Castillo Rodríguez C, Pérez García C C (1998). Metabolismo energético de los ruminantes: aspectos de interés Fisiopatológico. *Bovis N* 80: 13-29.
29. Dohoo I, Martín W, Stryhn H (2007). *Veterinary Epidemiologic Research*. 2a Ed. Charlottetown, AVC, 706 p.
30. Duffield T (2000). Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet Clin North Am: Food Anim. Pract*, 16 (2): 231-251.
31. East N (1983). Pregnancy toxæmia, abortions, and periparturient disease. *Vet Clin North Am: Food Anim. Pract* 5 (3): 601-617.
32. Ford E J, Evans J, Robinson I (1990). Cortisol in pregnancy toxæmia of sheep. *British Vet. J.*, 146: 539-542.
33. Gibbons A (1996). Efecto de la esquila sobre el peso al nacimiento de los corderos merino en el sistema extensivo patagónico. Curso Superior de producción animal, producción y alimentación. Zaragoza, Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza, p 1-13.
34. González-Montaña J R, Rojas López J (1995). Toxemia de la Gestación. *Med. Vet.*, 12 (9): 513-522.
35. González Montaña J R (2003). Patología de la nutrición y del metabolismo: Obesidad. Hiperlipidemia. Síndrome de la vaca gorda o esteatosis hepática. Cetosis bovina. Toxemia de la gestación ovina. En: Fidalgo Alvarez L E, Rojas López J, Ruiz de Gopegui R, Ramos Antón J J (eds). *Patología Médica Veterinaria*. Salamanca, Universidad de León, Universidad de Santiago de Compostela, Universidad de Zaragoza, p 330-379.
36. Harmeyer J, Schlumbohm C (2006). Pregnancy impairs ketone body disposal in late gestating ewes: Implications for onset of pregnancy toxæmia. *Res. Vet. Sci*, 81 (2): 254-264.
37. Heitmann R N, Dawes J D, Sensenig, S C (1987). Hepatic ketogenesis and peripheral ketones body utilization in ruminant. *J. Nutr.*, 117: 1174-1180.
38. Herdt, T H (1988). Fatty liver in dairy cows. *Vet Clin of North Am: Food Anim Pract*, 4: 269-287.
39. Herdt T H, Emery R S (1992). Therapy of diseases of ruminant intermediary metabolism. *Vet Clin of North Am: Food Anim Pract* 8(1):91-106.
40. Koenig M V, Contreras P A (1984). Alteraciones del metabolismo energético en Ruminantes y sus principales manifestaciones clínicas. *Arch. Med. Vet.*, 16 (1): 7-13.

41. Kupczyński R, Adamski M, Pogoda-Sewerniak K, Kuczaj M, Zawadzki W (2008). The comparison of methods of an assessment of β -Hydroxybutyrate acid and glucose in blood of cows, *Biol. Hod. Zwierz.*, 56 (566): 101–110.
42. Manazza, J (2006). Manejo de carneros y ovejas en servicio “a campo”. INTA EEA, Balcarce, Argentina; p 1-3.
43. Marteniuk J V, Herdt T H (1988). Pregnancy toxemia and ketosis ewes and does. *Vet. Clin. North Am: Food Anim. Pract.*, 4 (2): 307-315.
44. McMullen S, Osgerby J, Milne J, Wallace J, Wathes D. (2005) The Effects of Acute Nutrient Restriction in the Mid-gestational Ewe on Maternal and Fetal Nutrient Status, the Expression of Placental Growth Factors and Fetal Growth. *Placenta*, 26: 25-33.
45. Michaux J M, Fondeur S, Romdane M N, Mouthon G (1981). Les troubles du Métabolisme des corps cétoniques chez les mammifères Domestiques. *Rec Méd Vét*, 157 (6): 471-478.
46. Ndi bualonji B B, Godeau J M (1993). La neoglucogenese et les acides amines chez les ruminants: revue. *Ann. Med. Vet.*, 137: 537-554.
47. OPYPA (2016). Anuario OPYPA. Situación y perspectivas de la cadena ovina [online]. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/anuario_opypa_2016_en_baja.pdf
Fecha de consulta: 25/01/2017.
48. Orcasberro R. (1985) Nutrición de la oveja de cría. Seminario Técnico de Producción Ovina N°. II, Salto, Uruguay; p 91-107.
49. Pethick D W, Lindsay D B (1982). Metabolism of ketone bodies in pregnant sheep. *Br J Nutr*, 48: 549-563.
50. Radostits O, Gay C, Blood D, Hinchcliff K (2001). *Medicina Veterinaria: Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. 9ª Ed. Madrid, Interamericana, V2.
51. Reid I M (1980). Incidence and severity of fatty liver in dairy cows. *Vet Rec*, 107: 281-284.
52. Rhind S H (2004). Effects of maternal nutrition on fetal and neonatal reproductive development and function. *Anim Reprod Sci*, 82: 169–181.
53. Robinson J J (1996). Nutrition and reproduction. *Am Reprod Sci*, 42: 25-34.
54. Rodríguez-Merchán B, Casterás, A, Domingo E, Nóvoa F, Lólez Y, Cabezas-Agrícola J, Rivero T, Parramón M, Mesa J. (2011). Betahidroxibutirato capilar en la monitorización de la cetoacidosis diabética, *Endocrinol Nutr*, 58 (7): 347-352.

55. Romano J E, Rodas E, Lago I, Benech A, Ferreira A, Fernández F (1993). Efecto del progestágeno, PMSG y momento de la inseminación artificial a tiempo fijo en ovejas Corriedale durante la estación de cría. I Jornada Uruguay y II Latinoamericana de Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Salto, Uruguay; p 1- 5.
56. Rook J S (2000). Pregnancy toxemia of ewes, does, and beef cows. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.*, 16 (2): 293-317.
57. Rusell A F J, Doney J M, Reid R L. (1977). The use of biochemical parameters in controlling nutrition state in pregnancy ewes and the effect of undernourishment during pregnancy of lamb birth weight. *J Agric (Camb)*, 68: 351-358.
58. Russel A J F. (1984) Means of assessing the adequacy of nutrition of pregnant ewes. *Livestock Prod Sci*; 11:429-436.
59. Sargison N, Scott P, Penny C, Pirie R, Kelly J (1994). Plasma enzymes and metabolites as potential prognosis indices of ovine pregnancy toxemia. A preliminary study. *Br Vet J* 150: 271-276.
60. Schlumbohm C, Harmeyer J (2004). Hyperketonemia impairs glucose metabolism in pregnant and nonpregnant ewes. *J Dairy Sci*, 87: 350-358.
61. Scott P R, Woodman M P (1993). An outbreak of pregnancy toxemia in a flock of Scottish Blackface shepp. *Vet. Rec.*, 133 (24) 597-598.
62. Scott, P. (1995a). Differential diagnosis of common metabolic disorders of sheep. *In Practice*, 17(6): 266 – 269.
63. Scott P, Sargison N, Penny C, Pirie R S, Kelly J M (1995b). Cerebrospinal fluid and plasma glucose concentrations of ovine pregnancy toxemia cases, inappetant ewes and normal ewes during late pregnancy. *Br Vet Jour*, 151 (1) 39-44.
64. Sierra R, Bonino J, Larregui V, Echeguía M (1984). Toxemia de la preñez II. Inducción experimental y respuesta a la terapia con glicerol – propilenglicol. *Veterinaria*, 20 (88 – 89): 78-83.
65. Sigurdsson H (1988a). The effects of flock, number of fetuses and age on some biochemical blood constituents in ewes in late pregnancy under field conditions. *J Vet Med A*, 35: 417-423.
66. Sigurdsson H (1988b). Susceptibility to pregnancy disease in ewes and its relation to gestational diabetes. *Acta Vet Scand*, 29: 407-414.
67. SNIG (2016). Se presentaron datos preliminares de Declaración Jurada Anual de vacunos y ovinos [online]. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/se_presentaron_datos_preliminares_de_declaracion_jurada_anual_de_vacunos_y_ovinos.pdf

Fecha de consulta: 10/11/2016.

68. Sorondo ML, Cirio A (2011). Evaluation of the serum fructosamine test to monitor plasma glucose concentration in the late-pregnant sheep. *Anim. Prod. Sci.*, 51: 662-666.
69. SUL (2016). Inicios de la producción ovina en Uruguay [online]. Disponible en: <http://www.sul.org.uy/sitio/Inicios-de-la-produccion-ovina-en-Uruguay>. Fecha de consulta: 02/11/2016.
70. SUL (2015). Aportes a la producción ovina de calidad. *Lananoticias*; 171: 35
71. Van Saun R J (2000). Pregnancy toxemia in a flock of sheep. *JAVMA*, 217 (10): 1536-1539.
72. Wallace TM, Meston NM, Gardner SG, Matthews DR (2001). The hospital and home use of a 30-second hand-held blood ketone meter: guidelines for clinical practice, *Diabet Med.*, 18: 640-645.
73. Wallace TM, Matthews DR (2004). Recent advances in the monitoring and management of diabetic ketoacidosis. *Q J Med*, 97: 773-780.
74. West H J (1996). Maternal undernutrition during late pregnancy in sheep. Its relationship to maternal condition, pregnancy length, hepatic physiology and glucose metabolism. *Br J Nutr*, 75: 593-605.