

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**EVALUACIÓN DEL ÁCIDO-2-METIL-2-FENOXI-PROPIONICO COMO
ALTERNATIVA TERAPÉUTICA EN EL TRATAMIENTO DEL HÍGADO
GRASO EN LA TOXEMIA DE LA GESTACIÓN CLINICA OVINA**

Por:

Br Sebastián CHARAMELO FRANCO
Br Roberto GRAU STIRLING

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinaria
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2013**

PÁGINA DE APROBACIÓN:

Tesis de grado aprobado por:

Presidente de Mesa:

.....
Dr. Luis Barros

Segundo Miembro (Tutor):

.....
Dr. Luis Cal Pereyra

Tercer Miembro:

.....
Dra. Islamey Tebot

Cuarto Miembro (co-tutor)

.....
Dra. Stella Da Silva

Fecha: 8 de octubre de 2013

Autores:

.....
Br Braulio Sebastián Charamelo Franco

.....
Br.Roberto Julio Grau Stirling

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Teresa Franco porque si no fuera por ella no hubiera llegado a cumplir mi objetivo de esta carrera , a mi novia Carolina Fernández por aguantarme en el tiempo que estuvimos separados por prácticando , curso en Paysandú ,etc. A mi hermana Carolina Charamelo y a toda mi familia.

A mi familia de sangre y a la de corazón, Juan Reyes y Ricardo Donatti.

Los estudiantes que llevamos a cabo esta Tesis de grado deseamos agradecer a todas las personas e Instituciones que han colaborado para la concreción de este trabajo. Al Dr Alejandro Benech , Dra. Estela Da Silva ,Br Ximena Infante, Federico Feijo, Dra Andrea Martin por su trabajo brindado en la parte practica del ensayo.

A los funcionarios del Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria por su trabajo y dedicación continúa durante todo el experimento

Muy especialmente queremos agradecer al Dr. Luís Cal, docente de la Facultad de Veterinaria, por el seguimiento continuo del trabajo, aportes y experiencia, fundamentales para la realización de la tesis.

Este Proyecto fue financiado por laboratorio Fatro.

A Silvia Gallo por la traducción en ingles

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
PÁGINA DE AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	10
TOXEMIA DE LA GESTACIÓN.....	10
MODIFICACIONES METABÓLICAS EN EL BALANCE ENERGETICO NEGATIVO.....	10
EL HÍGADO GRASO.....	11
Inducción experimental de Toxemia de la gestación.....	11
DIAGNÓSTICO DE TOXEMIA DE LA GESTACIÓN.....	12
TRATAMIENTO DE LA TOXEMIA DE LA GESTACIÓN.....	12
RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES(PPARs).....	13
.....	
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
ANIMALES.....	15
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	15

DETERMINACIONES EN SANGRE DE LAS OVEJAS.....	16
BIOPSIAS HEPÁTICAS.....	16
ANÁLISIS DE LA MUESTRAS.....	17
Glicemia.....	17
BOHB.....	17
ASAT.....	17
Procesamiento de las muestras de biopsias hepáticas	17
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
CONCLUSIONES.....	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS:

	Página
GRAFICO N° 1 : EVOLUCIÓN DE LAS GLICEMIAS	19
GRAFICO N° 2: EVOLUCIÓN DEL BOHB.....	20
GRAFICO N° 3 : EVOLUCIÓN DEL ASAT.....	21
GRAFICO N°4 Biopsia hepática, Grupo A	22
GRAFICO N°5:Biopsia hepática,GrupoB.....	22
GRAFICO N° 6: Biopsia hepática ,Grupo C.....	23

RESUMEN

Se han ensayado distintas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la toxemia de la gestación ovina, con resultados variables. El objetivo de este trabajo fue evaluar un estimulante de los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR α) como alternativa terapéutica para revertir el hígado graso y corregir la alteración del metabolismo energético en la presentación clínica de esta patología. Treinta y seis ovejas Corriedale, gestando un solo feto, fueron divididas al azar en 3 grupos al día 130 de gestación. Se realizó un ayuno durante un máximo de 6 días para provocar toxemia clínica. Al retirarlas del ayuno se trataron con: Grupo A: 10 mg/kg de ácido 2-metil-2-fenoxi-propionico i/m c/24h durante 6 días; Grupo B: 10 mg/kg de ácido 2-metil-2-fenoxi-propionico i/m c/24 horas + 100 ml de glicerol-propilenglicol VO c/12 horas durante 6 días y Grupo Control: 100 ml de glicerol-propilenglicol VO c/12 horas durante 6 días. En el momento del encierro, durante el ayuno y tratamiento se sangraron diariamente para valorar glicemia y BOHB. Se evaluó la ASAT y se realizaron biopsias hepáticas al 130 días de la gestación, al inicio y finalización de los tratamientos, y 5 días tras el parto. Al primer día de comenzado los tratamientos se produjo una recuperación significativa de la glicemia en los tres grupos experimentales, así como una disminución del BHOB con diferencia de tiempo en los tres grupos. La actividad sérica de la ASAT no mostró diferencia significativa entre los tres grupos experimentales durante todo el ensayo. Las biopsias hepáticas luego del parto muestran que la recuperación de la esteatosis hepática fue más evidente en las ovejas de los grupos A y B. El ácido-2-metil-2-fenoxi-propionico se muestra como una alternativa eficaz para la recuperación del metabolismo energético en la toxemia de la gestación clínica, mostrándose asimismo como una alternativa eficaz para el tratamiento del hígado graso desarrollado en esta enfermedad.

SUMMARY

Therapeutic alternatives for ovine pregnancy toxemia treatment have been conducted with varying results. The aim of this study was to evaluate a stimulant of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR α) as a therapeutic alternative to reverse fatty liver and correct the energy metabolism alteration in the clinical presentation of this disease. Thirty-six Corriedale pregnant sheep with a single fetus were randomly divided into 3 groups at day 130 of gestation. Fasting was performed for up to six days to cause clinical toxemia. On removal of fasting they were treated with: Group A: 10 mg / kg of 2-methyl-2-phenoxy-propionic acid intramuscularly each 24h for 6 days; Group B: 10 mg / kg of 2-methyl-2-phenoxy-propionic acid intramuscularly each 24 hours + 100 ml of glycol glycerol administered orally every 12 hours for 6 days and the Control Group: 100 ml of glycol glycerol administered orally every 12 hours for 6 days. At the time of confinement, during fasting and treatment we bled them daily for assessing glycemia and BOHB. ASAT was evaluated and liver biopsies were performed at day 130 of gestation at treatment starting and ending and 5 days after birth. A significant glycemia recovery occurred on day first after treatment began in the three experimental groups, as well as a BHOB decrease with time difference in the three groups. ASAT Serum activity did not show any significant difference between the three experimental groups during the test. Liver biopsies after lambing show that hepatic steatosis recovery was more apparent in sheep of groups A and B. Acid-2-methyl-2-phenoxy-propionic is an efficient alternative for energy metabolism recovery in clinical pregnancy toxemia, showing also an effective alternative in fatty liver treatment developed.

INTRODUCCIÓN

En nuestro país la ganadería se ha desarrollado desde muy largo tiempo gracias a su rica dotación ecológica, transformándose en el eje central de la economía nacional, siendo dentro de ésta, la producción ovina una de las actividades de mayor importancia. Actualmente este rubro es responsable directo del aporte de un 20 % del producto bruto agropecuario y representa el 8,3 % de las exportaciones del Uruguay. Este sector de la producción nacional está sustentado por un total de 28.000 establecimientos agropecuarios, que brindan trabajo a aproximadamente 50.000 personas, teniendo en cuenta industrias vinculadas al mismo. En este contexto, la producción ovina se encuentra experimentando importantes cambios que representan nuevos desafíos para este sector en nuestro país. Actualmente existen además, nuevas propuestas y alternativas de producción (corderos pesados y lanas finas) que amplían las posibilidades de inversión dentro del sector.

Sin embargo persisten graves problemas que parecen haberse agudizado en los últimos años, como la baja eficiencia reproductiva y los elevados índices de mortandad ovina, los cuales constituyen unas de las principales restricciones productivas. Los bajos índices de señalada logrados fueron en parte responsables de la drástica reducción del stock ovino nacional. Este ha experimentado una importante reducción, desde el récord de 26 millones de cabezas en el año 1991, hasta el año 2004 en donde se produjo un estancamiento en los 9.000.000 aproximadamente, seguido de un paulatino pero lento incremento hasta la actualidad.

Por todo lo expuesto anteriormente, el desafío de encontrar caminos de crecimiento de la producción ovina está planteado. Son muchos los temas a tener en cuenta, pero sin dudas uno de los aspectos a considerar es la obtención de un alto número de corderos destetados por oveja cubierta, lo que constituye uno de los objetivos básicos de toda explotación ovina. La investigación dirigida a evitar la mortalidad de las madres, disponiendo de valores de referencia como indicadores del metabolismo energético y de la funcionalidad hepática de ovinos gestantes, resulta necesaria para tomar medidas tendientes a la prevención y/o tratamiento precoz de trastornos metabólicos como es la Toxemia de la gestación ovina.

Para el presente trabajo nos hemos planteado como hipótesis, que las ovejas con toxemia de la gestación clínica que son tratadas con ácido-2-metil-2-fenoxi-propionico van a tener una mejor recuperación del metabolismo energético así como una disminución del hígado graso, comparado con los tratamientos tradicionales que se usan en Uruguay (glicerol-propilenglicol).

REVISION BIBLIOGRÁFICA

TOXEMIA DE LA GESTACIÓN

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. Se produce como consecuencia de la incapacidad del organismo para mantener la homeostasis energética, al enfrentarse en esta etapa a un balance energético negativo. (Harmeyer y Schlumbohm, 2006; González Montaña, 2003; West, 1996; González Montaña y Rejas López, 1995; Sargison y col, 1994; Bonino y col, 1987). Si bien en otros países se la describe como una enfermedad asociada con gestaciones de dos o más corderos (Van Saun, 2000; Henze y col, 1998; Andrews, 1997; West, 1996; Scot, 1995; Sargison y col, 1994; Ford y col, 1990; Marteniuk y Herdt, 1988; East, 1983) en Uruguay esta patología se puede presentar en ovejas con gestaciones simples, principalmente en inviernos rigurosos con grandes carencias nutricionales, que agravan el balance energético negativo, provocando importantes pérdidas (Bonino y col, 1987).

MODIFICACIONES METABÓLICAS EN EL BALANCE ENERGÉTICO NEGATIVO

La última etapa de la gestación ovina se acompaña de un balance energético negativo, el cual es inducido por el desvío de glucosa y lactato hacia el feto (Harmeyer y Schlumbohm, 2006; Chilliard y col, 2000). En balance energético negativo el nutriente más limitante es la glucosa, ya que en los rumiantes ésta debe ser sintetizada mediante Neoglucogénesis (NG) hepática a partir de precursores ácido propiónico, los aminoácidos glucoformadores, el lactato y el glicerol, cuyo aporte es variable de acuerdo a los requerimientos (Contreras, 1998). Como resultado neto de esta nueva situación metabólica los rumiantes normalmente tienen una elevación de cuerpos cetónicos y una moderada disminución de la glucosa en sangre (González Montaña y col., 2008; Herdt y Emery, 1992). En consecuencia el tejido adiposo y el hígado resultan críticos para la adaptación metabólica, teniendo el músculo menor importancia (Contreras, 1998). El hígado es el regulador de la concentración de la glucosa sanguínea y del aporte de glucosa a los tejidos, ya que prácticamente es el único órgano donde se realiza la NG. Este órgano funciona, entonces, como un adaptador entre el balance energético negativo y el mantenimiento de los aportes metabólicos de energía a los tejidos

En respuesta al balance energético negativo el animal debe adaptar su metabolismo energético liberando energía de los lugares de depósito y realizar cambios en el uso de sustratos. Se moviliza tejido adiposo en forma de ácidos grasos no esterificados (NEFA), siendo la baja concentración sérica de glucosa e insulina el principal estímulo para la movilización de lípidos (Chilliard y col, 2000; Herdt y Emery, 1992; Chilliard, 1987; Brockman y Laarveld, 1985).

EL HÍGADO GRASO

Los ácidos grasos viajan hacia el hígado unidos a la albumina. Una vez en el hígado estos ácidos grasos tienen dos vías metabólicas, la oxidación o la esterificación. Los triglicéridos sintetizados en el hígado deben ser incorporados en macromoléculas llamadas lipoproteínas para ser secretados, 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 (Burt, 2001; Contreras, 1998; Herdt y Emery, 1992; Herdt, 1988; Reid, 1980).

En el hígado la cetogénesis se realiza a partir de la aceti-CoA. La cantidad de cuerpos cetónicos que se forman en éste órgano depende de la magnitud de la lipomovilización. El acil-CoA como tal, no puede entrar en la mitocondria necesitando de un sistema transportador, la carnitina. Por acción de la carnitina acil transferasa, el acil-CoA atraviesa la membrana mitocondrial. La entrada de ácidos grasos a la mitocondria se ve frenada por la enzima malonil-CoA, ésta parece inhibir la acción de la carnitina aciltransferasa. La acetyl-CoA en el interior de la mitocondria tiene dos caminos, 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. Cuando la cantidad de grasa movilizada excede la capacidad de oxidación del hígado las moléculas de acetyl-CoA no ingresan al ciclo de Krebs, por insuficiencia de oxalacetato, así el acetyl-CoA excedente da origen a los cuerpos cetónicos (Cirio y Tebot, 2000). Fromenty y Pessayre (1997) aseguran que cuando la β -oxidación es severamente alterada, los ácidos grasos son pobremente oxidados en las mitocondrias de los hepatocitos, siendo entonces abundantemente esterificados a triacilglicéridos (TAG), los cuales son acumulados en pequeñas vesículas. Cuando la incorporación hepática de ácidos grasos es muy abundante como sucede durante una importante lipomovilización, las posibilidades de transporte de los TAG sintetizados se deprime a consecuencia de una disminución de la síntesis hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Revisado por Cirio y Tebot (2000) afirman que esta disminución en la síntesis de VLDL podría deberse fundamentalmente a dos factores: 1) la tasa de ensamblado de las VLDL y de exportación de los TAG en esas VLDL es naturalmente baja en el hígado de los rumiantes, por lo tanto cualquier aumento importante en la síntesis de TAG puede superar la capacidad del hepatocito para exportarlos en las VLDL y 2) la baja disponibilidad de aminoácidos para la síntesis de la apoproteína, la cual es imprescindible para el montaje de las VLDL.

Inducción experimental de Toxemia de la gestación

La toxemia puede ser inducida para su estudio fisiopatológico. Se ha demostrado que el ayuno a partir del día 130 de gestación durante un máximo de seis días permite reproducir un cuadro clínico de Toxemia de la gestación en ovejas Corriedale que portan un solo feto (Cal Pereyra, 2007). Se demostró asimismo que el ayuno provocó una rápida movilización de TAG desde el tejido adiposo, lo que se vio reflejado en el rápido ascenso de los valores de los NEFA, representando el cambio sanguíneo más precoz en las ovejas sometidas a ayuno. Este incremento de la movilización lipídica en ovejas

sometidas a ayuno provocó una alta incidencia de esteatosis hepática en estos animales (Cal Pereyra, 2007). La correlación positiva encontrada entre la actividad sérica de la enzima aspartato aminotransferasa (ASAT) y el grado de vacuolización hepática indica que esta enzima podría ser un indicador precoz y fiable del daño hepático en ovejas con Toxemia de la gestación clínica (Cal Pereyra, 2007).

DIAGNÓSTICO DE TOXEMIA DE LA GESTACIÓN

Frecuentemente el comienzo de los signos clínicos se produce de forma brusca, aunque el trastorno metabólico se pueda estar desarrollando desde un tiempo atrás en forma subclínica (Martín, 2002; Bonino y col, 1987). Los animales se muestran apáticos, torpes y lentos, pero aún tienen capacidad para acompañar el rebaño (Rook, 2000). Si la enfermedad progresa, las ovejas se retrasan y separan de la majada. Cuando aumenta el grado de depresión no reaccionan frente la presencia del hombre o perros, hay pérdida de reflejos auditivos y oculares, marcha dificultosa chocando contra objetos, tendencia a permanecer inmóviles presionando la cabeza contra objetos. Es común el rechinar de dientes producido por movimientos reflejos de la mandíbula y la lengua (González Montaña y Rejas López, 1995; Marteniuk y Herdt, 1988; Bonino y col, 1987; Koenig y Contreras, 1984). El animal disminuye la ingesta de agua y alimentos mostrando constipación y heces duras (Rook, 2000; Andrews, 1997; Gonzales Montaña y Rejas López, 1995). En las últimas etapas la acidosis metabólica causada por el aumento de los cuerpos cetónicos incrementa la frecuencia respiratoria, frecuentemente se producen contracciones mioclónicas de la cabeza, espalda y extremidades, sutiles episodios convulsivos y el animal termina en decúbito esternal con la cabeza girada hacia el flanco, progresando al decúbito lateral, donde puede permanecer por 3 o 4 días en una depresión profunda, muriendo el 80 a 90% de los casos no tratados (Rook, 2000; González Montaña y Rejas López, 1995; Marteniuk y Herdt, 1988).

Gran parte de los signos clínicos pueden ser explicados por la intensa hipoglicemia que sufren las ovejas afectadas de toxemia de la gestación, la depresión del metabolismo neuronal se ve intensificado por el efecto directo que posee el acetoacetato de disminuir el consumo cerebral de oxígeno (Radostits y col, 2002; González Montaña y Rejas López, 1995; Bonino y col, 1987).

TRATAMIENTOS DE LA TOXEMIA DE LA GESTACIÓN

Se han descrito varios tratamientos para la toxemia de la gestación con resultados variables (West, 1996; Ranaweera y col, 1979). Los resultados obtenidos por diferentes autores han sido además contradictorios (Andrews, 1997; Marteniuk y Herdt, 1988; Bonino y col, 1987; Andrews, 1982). Para González Montaña y Rejas López (1995) el objetivo prioritario en el tratamiento de la toxemia de la gestación es el aumento de la formación de glucosa y su utilización a nivel tisular, debiendo incrementar también la utilización de los cuerpos cetónicos o disminuir su producción mejorando el metabolismo lipídico.

Una alternativa para el tratamiento de la toxemia de la gestación, la cual

en Uruguay es la que tiene la mayor difusión, es el uso de propilenglicol (Acetolena®), como precursor de la glucosa (Bonino y col, 1987). Este se administra de forma oral, la mayor parte es absorbido desde el rumen, sin ser previamente metabolizado a ácido propiónico. El metabolismo del propilenglicol a glucosa ocurre probablemente vía conversión a piruvato, con la consiguiente producción de oxaloacetato mediante la piruvato carboxilasa (Emery y col, 1967). El aumento del oxaloacetato disponible, probablemente produzca un aumento del citrato suprimiendo de esta forma la cetogénesis (Herdt y Emery, 1992).

La eficacia de los compuestos precursores de la síntesis de glucosa por el hígado, son de utilidad siempre que no exista un severo compromiso del órgano (Rook, 2000; Bonino y col, 1987). Es posible que la capacidad de utilizar el propilenglicol se reduzca en la lipidosis hepática, además debe ser usado con criterio para prevenir su acumulación, la cual contribuye a la aparición de depresión y somnolencia en grandes dosis (Herdt y Emery, 1992).

RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES (PPAR_S)

Se ha demostrado que los ácidos grasos participan en la regulación del metabolismo energético principalmente a través de su interacción con los Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales (PPAR_S) (De Brito Gomes, 2006; Uauy y col, 2000). Estos receptores nucleares lípido-activables tienen un rol importante en la transcripción y regulación de los genes involucrados en el metabolismo de los lípidos, así como en la homeostasis energética (Uauy y col, 2000). Los PPARs pueden ser activados también por sustancias llamadas fibratos o ligantes (De Brito Gomes, 2006; Hermes Toro, 2005). Existen tres tipos de estos receptores nucleares: PPAR_α, PPAR_β y PPAR_γ, los cuales se distribuyen en distintos tejidos y con funciones específicas diferentes (Uauy y col, 2000). Los PPAR_α se expresan en forma mayoritaria en tejidos con alto contenido en mitocondrias, y donde se produce β-oxidación peroxisomal como en el hígado principalmente, músculo esquelético, corazón, riñón, grasa parda y adrenales (Desvergne B y Wahli W, 1999). Los peroxisomas son orgánulos citoplasmáticos de las células eucariotas en forma de vesículas que albergan enzimas que catalizan importantes reacciones metabólicas, en su mayoría vinculadas al metabolismo de lípidos, como ser enzimas de la β-oxidación de ácidos grasos (Osmunsen y col, 1991), un 25% de los ácidos grasos son degradados en los peroxisomas y el resto en las mitocondrias (Wierzbicki, 2007; Latruffe y col, 2001).

Los PPAR_α estimulan la β-oxidación mitocondrial y peroxisomal, modulando la expresión de genes que codifican para la AcilCoa-deshidrogenasa (Gulick T y col, 1994), también inducen fuertemente la enzima carnitina palmitoil transferasa I, la cual permite el pasaje de los ácidos grasos de larga cadena al interior de la mitocondria para ser oxidados (Foxworthy PS y col, 1990; Brady PS y col, 1989). Por lo tanto los PPAR_α aumentan la oxidación de los ácidos grasos y disminuyen su esterificación en el hígado (Steiner G, 2005).

Los PPAR_α participan además en la homeostasis energética regulando la expresión de genes implicados en la neoglucogénesis (De Brito Gomes, 2006;

Uauy y col, 2000), ya que estimulan en el hígado la síntesis de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) (Tontonoz P y col, 1995).

Los fibratos son compuestos hidrosolubles derivados del ácido fibrico. Estos compuestos, actuando sobre los PPAR mejoran el catabolismo de partículas ricas en triacilglicéridos y reducen la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), al mismo tiempo que estimulan la producción de las apolipoproteínas de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). También incrementan la actividad de la lipoproteinlipasa (LPL) (Desvergne B y Wahli W, 1999; Bilheimer DW, 1991; Kirby B, 1991).

El Ácido 2-Metil-2-Fenoxi-Propiónico (Hepagen ®), es un fibrato estimulante específico de los PPAR α , actuando de la misma manera que los ligantes naturales. Éste se une a los PPAR α interactuando en la regulación de genes implicados en el metabolismo lipídico y glucídico al promover la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal, y la neoglucogénesis hepática (Schütze-Segen, 2008). La utilización de este fibrato podría interactuar en el metabolismo lipídico en ovejas afectadas con toxemia de la gestación, disminuyendo la acumulación de triacilglicéridos en el hepatocito. Si bien existen trabajos sobre la utilización de fibratos en ratones, humanos, cerdos y vacas lecheras (Desvergne B and Wahli W, 1999), no se encontraron datos bibliográficos que hayan probado este producto en la toxemia de la gestación ovina, aunque se encuentra indicado en el prospecto del mismo.

HIPOTESIS

Para el presente trabajo nos hemos planteado como hipótesis, que las ovejas con toxemia de la gestación clínica que son tratadas con ácido-2-metil-2-fenoxi-propionico tendrían una mejor recuperación del metabolismo energético así como una disminución del hígado graso.

OBJETIVOS

Objetivos Generales:

- 1) Evaluar un estimulante específico de los PPAR α como alternativa terapéutica en el tratamiento del hígado graso en la toxemia de la gestación ovina clínica.
- 2) Evaluar la incidencia del tratamiento de la esteatosis hepática sobre la normalización del metabolismo energético en ovejas con Toxemia de la gestación clínica.

Objetivos Específicos:

- 1) Evaluar la eficacia del ácido-2-metil-2-fenoxi-propionico solo o combinado con glicerol-propilenglicol para revertir el hígado graso en ovejas con Toxemia de la gestación clínica.

- 2) Evaluar la eficacia del ácido-2-metil-2-fenoxi-propionico solo o combinado con glicerol-propilenglicol para restablecer el equilibrio en el metabolismo energético en ovejas con Toxemia de la gestación clínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los protocolos de investigación se llevaron a cabo en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria, Libertad, Departamento de San José (34° 38´S; 56° 39´W). El protocolo experimental fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA).

ANIMALES

Fueron utilizadas 60 ovejas Corriedale adultas, entre 4 y 6 años, identificadas por medio de caravanas numeradas y dos carneros de la misma raza de 4 años. Estas fueron seleccionadas de un total de 90 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).

Los celos de estas ovejas fueron sincronizados con esponjas intravaginales conteniendo 60mg de medroxiprogesterona (Sincrovin[®], Santa Elena) durante 12 días (Romano y col, 1993). Una vez retiradas las esponjas se realizó el servicio por monta natural usando 2 carneros de la misma raza, provistos con arneses marcadores, controlándose las montas durante cuatro días. Se registro el día de la monta como el día cero (0) de la gestación. Al día 60 tras retirar los carneros se realizó el diagnóstico de gestación por ultrasonografía (Buckrell, 1988), descartándose del protocolo las ovejas vacías y las portadoras de dos o más fetos, seleccionando de esta forma 36 ovejas gestando un solo feto.

Posteriormente a la cubrición, todos los animales pasaron a alimentarse en un potrero con pastura natural.

DISEÑO EXPERIMENTAL

En el día 130 de gestación las ovejas fueron divididas al azar en tres grupos de 12 animales cada uno (A, B, y C). A partir de ese momento todas las ovejas fueron encerradas en corrales techados y con piso de hormigón. Durante el encierro fueron sometidas a un ayuno total de forraje, teniendo acceso únicamente al agua de bebida, hasta que los animales presentaron síntomas clínicos de toxemia de la gestación. Se consideró el inicio clínico de la enfermedad cuando se manifestaron al menos 2 de los siguientes síntomas: rechinar de dientes, indiferencia ante la presencia humana, presión de la cabeza contra objetos y temblores musculares. El tiempo de ayuno fue como máximo de 6 días, retirándose del protocolo experimental las ovejas que no presentaron síntomas clínicos de la enfermedad antes de completado ese tiempo de ayuno (Cal Pereyra, 2007). Los animales que manifestaron toxemia

clínica fueron retirados del ayuno a las 12 horas del comienzo de la misma, pasando a alimentarse en un potrero con pastura natural y recibiendo el siguiente protocolo de tratamiento:

Grupo A (n=12): 10 mg/kg de ácido 2-metil-2-fenoxi-propionico (Hepagen[®], Fatro) i/m cada 24 horas por un período de 6 días

Grupo B (n=12): 10 mg/kg de ácido 2-metil-2-fenoxi-propionico (Hepagen[®], Fatro) i/m cada 24 horas + 100 ml de glicerol-propilenglicol vía oral cada 12 horas por un período de 6 días

Grupo C (n=12): (grupo control), 100 ml de glicerol-propilenglicol vía oral cada 12 horas por un período de 6 días (Cal Pereyra, 2007; Sienna y col, 1984)

El grupo C fue considerado grupo control teniendo en cuenta que el tratamiento con glicerol-propilenglicol constituye uno de los tratamientos de mayor difusión para la toxemia de la gestación en Uruguay (Bonino y col, 1987), así como en otros países (Rook, 2000; Marteniuk y Herdt, 1988). Los resultados de este tratamiento muestran una respuesta de un 50 % en relación a la normalización de los parámetros metabólicos en animales con Toxemia de la gestación clínica (Cal Pereyra, 2007; Koenig y Contreras, 1984).), mientras que este mismo tratamiento no logró resultados satisfactorios en la recuperación del hígado graso provocado por esta enfermedad (Cal Pereyra, 2007).

DETERMINACIONES EN SANGRE DE LAS OVEJAS

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena yugular con jeringas de 10ml y agujas 18G. Todas las ovejas fueron sangradas al día 130 de gestación, al inicio y finalización de los tratamientos y 5 días tras el parto, para determinar la actividad sérica de la aspartato aminotransferasa (ASAT). Desde el día 130 de la gestación y hasta finalizar los tratamientos todas las ovejas se sangraron diariamente para valorar BOHB y glicemia. La sangre para determinación de glicemia se colectó en tubos con fluoruro de sodio y EDTA, mientras que para las demás determinaciones se colectó en tubos secos. Las determinaciones de ASAT se realizaron dentro de las doce horas posteriores a la recogida de los sueros y las muestras para determinar glicemia y BOHB se almacenaron congeladas a -20°C en tubos Eppendorf debidamente rotulados e identificados hasta su procesamiento.

BIOPSIAS HEPÁTICAS

Inmediatamente después de obtener las muestras de sangre se realizaron biopsias hepáticas a todos los animales por aspiración con aguja fina, siguiendo la técnica descrita por Cruz y col (2005), al día 130 de gestación (comienzo del ayuno), al inicio y finalización de los tratamientos, y 5 días tras el parto. Las muestras de hígado inmediatamente tras su obtención fueron fijadas en una solución de formalina bufferada al 10 %, hasta su procesamiento

ANÁLISIS DE LA MUESTRAS

La glicemia, BHOB y ASAT se determinaron por métodos enzimáticos, en el Laboratorio de Fisiopatología de la Facultad de Veterinaria, utilizando los kits Glucose Liquicolor® (Human,Germany), Ranbut® (Randox Laboratories Ltd.UK) y GOT(ASAT) ® (Human,Germany) respectivamente, realizándose su lectura en un colorímetro digital HUMALYSER JUNIOR(Germany).

Glicemia

Para la determinación de glicemia se utilizo suero. La glucosa presente en el mismo se determina después de la oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa con la formación de peroxido de hidrógeno el cual reacciona bajo la catálisis de peroxidasa y 4-aminofenazona, formando un complejo rojo violeta usando la quinoneimina como indicador; midiéndose la absorbancia a 500 nm. a una temperatura de 37 °C.

BHOB

Para la medición de BHOB se utilizo suero. El método se basa en la oxidación del D-3-hidroxi butirato en aceto-acetato por la enzima 3-hidroxi butirato deshidrogenasa, concomitantemente con la oxidación el cofactor NAD⁺ es reducido a NADH. Esto está asociado con un cambio de la absorbancia que es directamente proporcional a la concentración de D-3-hidroxi butirato. La lectura se realizo a 330 nm. a una temperatura de 37 ° C.

ASAT

Para la medición de la Aspartato aminotransferasa se utilizo suero. Mediante este método, que es una reacción química enzima–sustrato, se produce la reducción de NADH en presencia de ASAT de acuerdo a la cantidad de enzima presente en el suero analizado. Se midio la absorbancia a 340 nm, a una temperatura de 37°C.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE BIOPSIAS HEPÁTICAS.

Las muestras se procesaron por técnica histológica de rutina siguiendo el método de procesamiento rápido para piezas de 4 mm (Ann Preece, 1972). Se cortaron a 5 µm, se colorearon con hematoxilina-eosina y se observaron en un microscopio óptico (Olimpus® BH2). El diagnóstico histopatológico se realizo usando un sistema numérico ciego y de acuerdo al siguiente protocolo:

a) diagnóstico de esteatosis (positivo o negativo)

b) la extensión de la esteatosis fue evaluada tomando al lobulillo hepático como unidad estructural, en tres zonas (zona I: periportal, zona II: intermedia y zona III: centrolobulillar) (Cal Pereyra y col., 2009).

c) el grado de lesión o vacuolización se clasifico según Stokhaus y col (2004) en 3 grados (grado 1: pequeña cantidad de gotas en pocas células; grado 2: cantidad variable de gotas en la mayoría de las células y grado 3: grandes cantidades de gotas en la mayoría de los hepatocitos).

La extensión de la esteatosis fue evaluada a 200 aumentos (X 200) y la severidad de la vacuolización de las células fue evaluada a 400 aumentos (X 400).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significación de las diferencias entre los grupos en el peso vivo, en la actividad sérica de la ASAT y en los niveles séricos de glicemia y BHOB, fue evaluada mediante un ANOVA de una vía seguido de Tukey. Se analizó la extensión de la esteatosis dentro del acino hepático (Zonas I, II y III) mediante el estudio del porcentaje de animales afectados en cada grupo experimental.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA 6.0. Se consideraron diferencias significativas cuando $\alpha < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el gráfico 1 se muestran la evolución de las glicemias. Al día 130 de gestación, comienzo del ayuno, no se encontraron diferencias significativas en los valores de glicemia en los tres grupos experimentales (Grupo A: 42.13 ± 10.1 ; Grupo B: 43.6 ± 8.4 y Grupo C: 40.3 ± 5.5 mg/dl). A partir de ese momento, la glicemia descendió en los tres grupos, coincidiendo con lo observado por West (1996) y Sigurdsson (1988b), quienes afirman que en las ovejas sometidas a ayuno la supresión del alimento desencadena una brusca caída de la glicemia. Se comenzaron a observar signos clínicos de toxemia de la gestación a los 4 días de iniciado el ayuno y hasta los 6 días de iniciado el mismo. Al momento de presentar signos clínicos de la enfermedad, los valores de glicemia de los tres grupos no mostraron diferencias significativas (Grupo A: 31.92 ± 9.6 ; Grupo B: 31.7 ± 10.1 y Grupo C: 30.68 ± 12.0 mg/dl). Estos valores coinciden con los encontrados por Sigurdsson (1988b), quien observó que al momento de la presentación de síntomas clínicos de toxemia, la glicemia osciló entre 19.81 y 36.00 mg/dl. Al primer día de comenzado los tratamientos se produce una recuperación significativa de la glicemia en los tres grupos experimentales ($P < 0.04$; $P < 0.01$ y $P < 0.001$; Grupo A, Grupo B y Grupo C respectivamente), siendo este aumento significativamente mayor en los Grupos B y C ($P < 0.0007$ y $P < 0.0005$) con respecto al Grupo A respectivamente. Esta diferencia se mantuvo hasta las 48 horas de iniciado el tratamiento. Sin embargo la glicemia de los Grupos B y C no mostró diferencias significativas durante todo el tratamiento. El aumento de la glicemia en los Grupos B y C coincide con lo encontrado por Cal Pereyra (2007), quien obtuvo un aumento de 32.2 ± 13.5 a 58.6 ± 8.6 mg/dl a las 12 horas de iniciado el tratamiento con glicerol-propilenglicol. El aumento precoz de la glicemia en estos grupos se explica ya que el 40 % del propilenglicol es absorbido intacto desde el rumen (Hedt y Emery, 1992), alcanzando sus máximos valores en sangre a los 30 minutos de su administración. Mientras que el aumento de la glicemia en el Grupo A podría ser más lento ya que el ácido 2-metil-2-fenoxi-propionico es un fibrato que actúa regulando la expresión de genes implicados en la neoglucogénesis (De Brito Gomes, 2006; Uauy y col, 2000). Ver Gráfico N°1 Evolución de las glicemias.

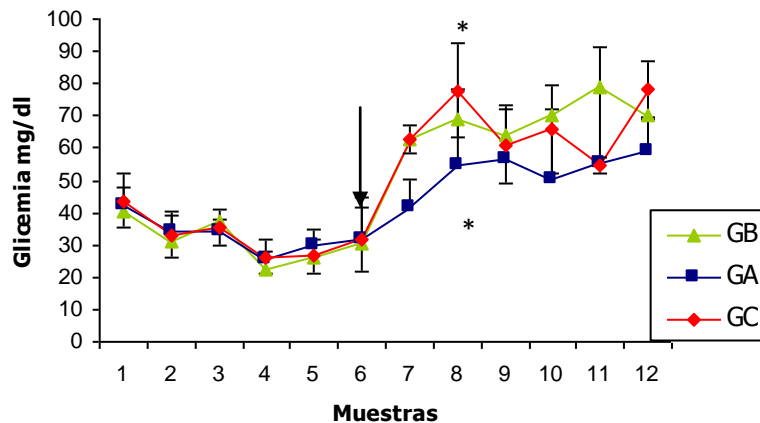


Gráfico N° 1: Evolución de las glicemias en los tres grupos experimentales (mg/dl), expresado en medias \pm ds. La flecha indica el primer día de tratamiento. GC: Grupo Control (Acetolena®), GA: Hepagen® y GB: Acetolena® + Hepagen®. A las 24hs de iniciado el tratamiento se observa un aumento significativo de la glicemia en los tres grupos (GA y GB: $p < 0.05$ y GC: $p = 0.01$). Este aumento fue significativamente mayor en los grupos B y C con respecto al A (*: $p < 0.01$).

En el gráfico N°2 se observa la evolución de los valores séricos de BOHB durante el protocolo experimental. No se encontraron diferencias significativas al momento del encierro (Grupo A: 1.17 ± 0.621 ; Grupo B: 0.88 ± 0.34 Grupo C: 1.15 ± 0.62 mmol/l). Como se muestra en el gráfico 2, al momento de la presentación de los síntomas clínicos tampoco se encontraron diferencias significativas en los valores de este cuerpo cetónico entre los tres grupos experimentales (Grupo A: 3.26 ± 1.48 ; Grupo B 3.50 ± 0.86 y Grupo C: 3.52 ± 0.74 mmol/l). Los tres grupos presentaron valores de BHOB mayores a 3.0 mmol/l, indicadores de toxemia de la gestación clínica (Andrews, 1997 y Cal Pereyra, 2007). Una vez comenzado los tratamientos los tres grupos presentaron una disminución de los valores sanguíneos de BHOB. Esta disminución fue significativa a las 24hs en el grupos B ($p < 0.05$), a las 48hs en el grupo C ($p < 0.05$) y a las 72hs en el grupo A ($p < 0.01$). No se encontró diferencias entre los grupos. La disminución en la concentración de BOHB en los grupos tratados con glicerol-propilenglicol es debida a que este aporta glucosa, la cual incrementa la relación insulina/glucagón, disminuyendo la cetogénesis (Herdt y Emery, 1992). La cetogenesis disminuye en el tratamiento con Hepagen, ya que este se uniría a los PPAR α interactuando en la regulación de genes implicados en el metabolismo lipídico, los cuales promueven la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal, (Schütze-Segen, 2008). Asimismo los PPAR α activados disminuyen la esterificación de los ácidos grasos en el hígado (Steiner G, 2005).

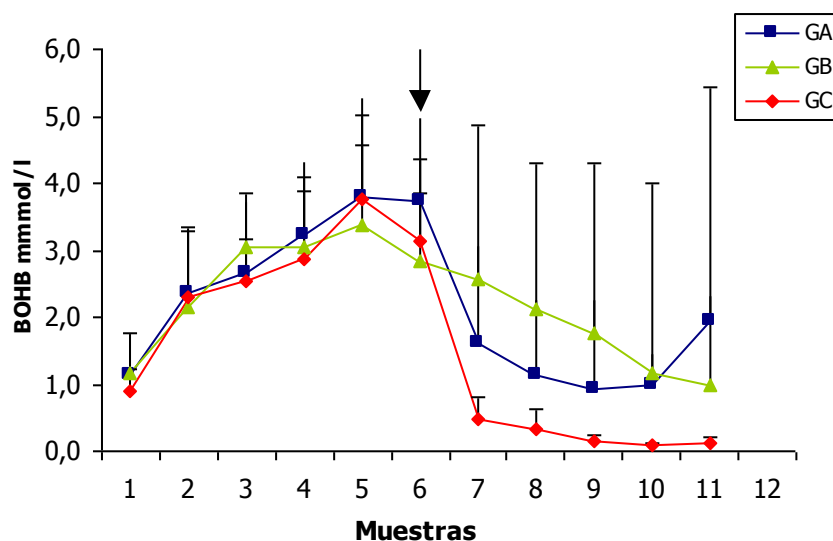


Gráfico N° 2: Evolución de los valores sanguíneos de BOHB en los tres grupos experimentales (mmol/l), expresado en medias \pm ds. La flecha indica el primer día de tratamiento. GC: Grupo Control (Acetolena®), GA: Hepagen® y GB: Acetolena® + Hepagen®. A las 24hs de iniciado el tratamiento se observa una disminución de los valores séricos del grupo B ($p < 0.05$), a las 48hs en el grupo C ($p < 0.05$) y a las 72hs en el grupo A ($p < 0.01$).

La actividad sérica de la ASAT no mostró diferencia significativa entre los tres grupos experimentales durante todo el ensayo, observándose una disminución de su actividad desde finalizado el tratamiento (Grupo A: 273.22 ± 111.94 ; Grupo B: 299.35 ± 169.81 y Grupo C: $400,44 \pm 254.42$ UI/l), hasta la última muestra obtenida luego del parto (Grupo A: 170.41 ± 25.8 ; Grupo B: 173.97 ± 65.04 y Grupo C: 229.01 ± 91.32 ; UI/l), observándose solo una leve tendencia en este momento entre el Grupo C y el Grupo A ($P < 0.078$). La correlación positiva encontrada por Cal Pereyra (2007) entre la actividad sérica de esta enzima y el grado de vacuolización hepática, nos estaría indicando la recuperación hepática con los tratamientos instaurados. (Ver gráfico N° 3).

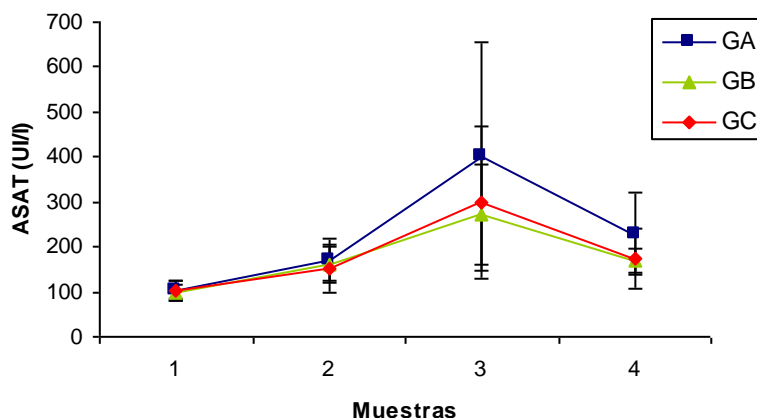


Gráfico N°3: Evolución de los valores sanguíneos de ASAT en los tres grupos experimentales (UI/l), expresado en medias \pm ds. GC: Grupo Control (Acetolena®), GA: Hepagen® y GB: Acetolena® + Hepagen®. Muestra 1: día del encierro, muestra 2: inicio del tratamiento, muestra 3: fin del tratamiento y muestra 4: 5 días posparto.

Con respecto a las biopsias hepáticas, debido al escaso número de muestras obtenidas no fue posible realizar un test estadístico fiable. Sin embargo es posible apreciar el comportamiento biológico de los diferentes tratamientos, que son expresados en porcentaje. Se observó que al inicio de los tratamientos el grupo A presentó un 45.5 %, 27.3 % y 27.3 % de las ovejas con esteatosis en la zona III, II y I respectivamente (Ver gráficoN°4). En el mismo momento las ovejas del grupo B presentaron un 54.5 %, 27.3 % y 18.2 % de esteatosis en las zonas acinares III, II y I respectivamente.(Ver gráficoN°5) Al analizar los resultados de las biopsias hepáticas del grupo C al inicio de los tratamientos, encontramos resultados similares, presentando esteatosis un 55 %, 27 % y 18 % de las ovejas en las zonas III, II y I respectivamente.(Ver gráfico N°6).

Al finalizar los tratamientos los animales del grupo A presentaron los siguientes resultados: Zona III 27,4 %, zona II 36.3 % y zona I 36.3 % de los mismos.(Ver gráfico N°4) En el grupo B, al culminar con el tratamiento se comprobaron los siguientes resultados: Zona III 27.3 %, zona II 27.3 % y zona I 45.5 % de los mismos. (Ver gráficoN°5) Los porcentajes de ovejas con esteatosis al finalizar el tratamiento en el grupo C fueron los siguientes: 63.6 %y 36.4 % en las zonas III, II respectivamente. (Ver gráfico N°6).

Los resultados obtenidos de las biopsias hepáticas 5 días luego de producido el parto muestran que la recuperación de la esteatosis hepática fue más evidente en las ovejas del grupo A, (33.3 % y 66.7 % de las ovejas con esteatosis en la zonas II y I respectivamente. Ningún animal presento esteatosis en la zona III del acino hepático)(Ver gráficoN°4); mientras que los animales pertenecientes al grupo C fueron los que presentaron una menor recuperación hepática en este momento, al presentar una mayor extensión del acino con esteatosis hepática (50 %, 16.7 % y 33.3 % de las ovejas con esteatosis en la zona III, II y I respectivamente. .(Ver gráfico N°6). Las ovejas del grupo B presentaron estos resultados luego del parto: zona II, 33, 3 % y zona I, 66.7 % de los animales. Ninguna oveja presento esteatosis en la zona III del acino hepático. (Ver gráficoN°5). Los grupos A y B mostraron resultados

similares, destacándose que ambos grupos compartieron el ácido-2-metil-2-fenoxy-propionico en su tratamiento.

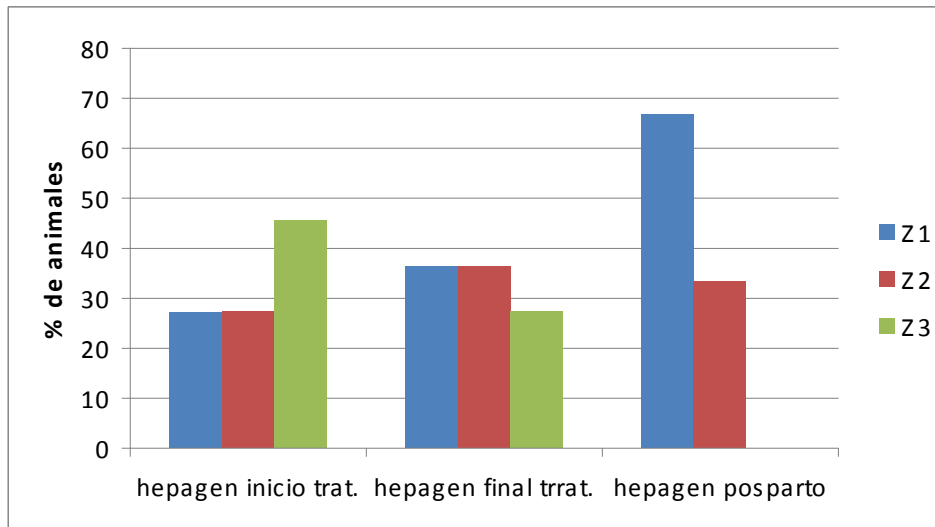


Gráfico N°4: Resultados de biopsias hepáticas en el grupo Hepagen® (Grupo A). Se observa el porcentaje de animales afectados en las zonas I, II y III del hepatocito (Z1, Z2 y Z3) en cada momento del ensayo.

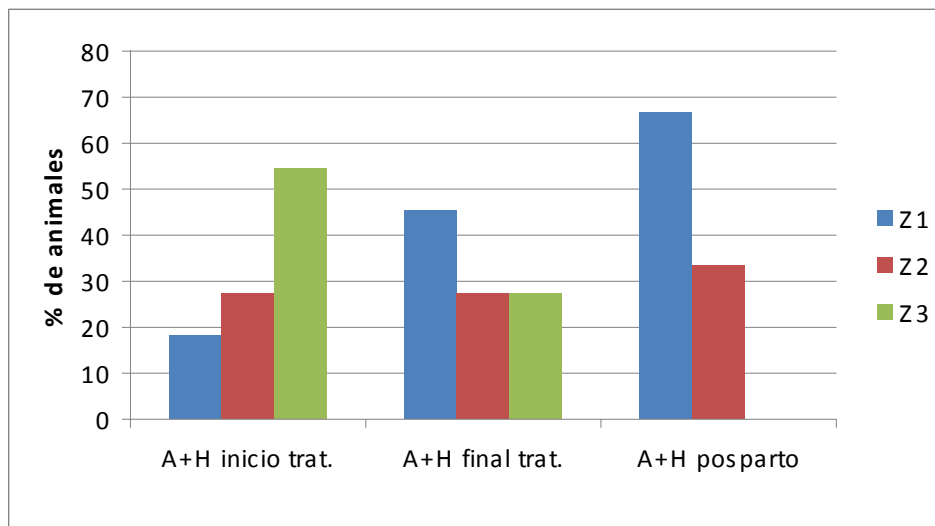


Gráfico N°5: Resultados de biopsias hepáticas en el grupo Hepagen® + Acetolena® (Grupo B). Se observa el porcentaje de animales afectados en las zonas I, II y III del hepatocito (Z1, Z2 y Z3) en cada momento del ensayo.

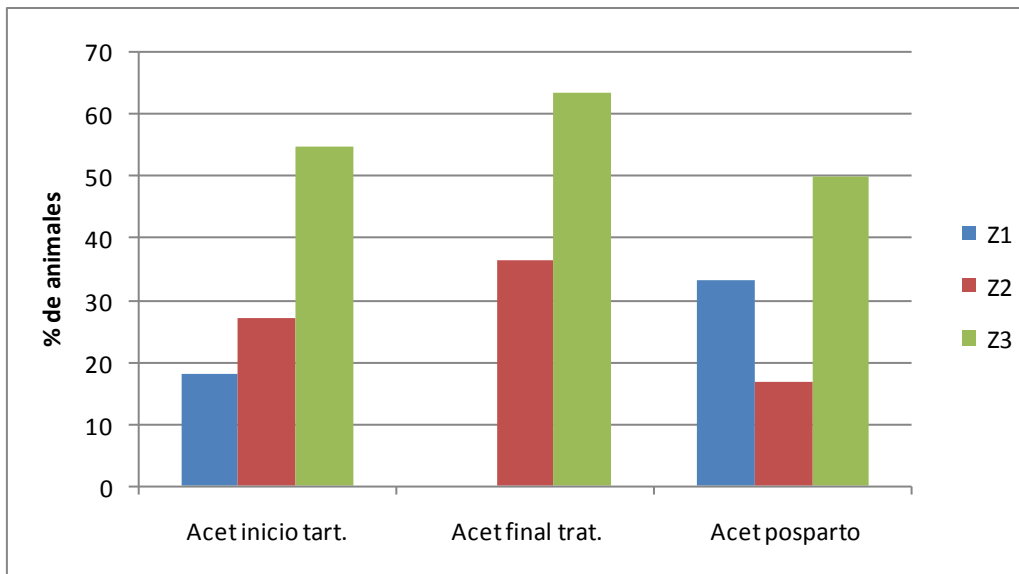


Gráfico N°6: Resultados de biopsias hepáticas en el grupo control (Acetolena®) (Grupo C). Se observa el porcentaje de animales afectados en las zonas I, II y III del hepatocito (Z1, Z2 y Z3) en cada momento del ensayo.

CONCLUSIONES

Si bien las concentraciones de glicemia y BHOB se recuperan más lentamente en el Grupo A, el ácido-2-metil-2-fenoxi-propionico se muestra como una alternativa eficaz para la recuperación del metabolismo energético en la toxemia de la gestación, ya que se pudo observar un aumento de la glicemia, disminución en la concentración de BOHB, también como una alternativa para el tratamiento del hígado graso desarrollado en esta enfermedad, ya que muestra los mejores resultados en cuanto al tratamiento de la esteatosis hepática por lo que se observó en las biopsias hepáticas 5 días posparto, como en la disminución sérica de la ASAT. Otra ventaja que tiene es que su aplicación es IM cada 24 hs, y el tratamiento más utilizado (glicerol-propilenglicol) es oral cada 12 hs, por ende a nivel de manejo terapéutico resultaría más práctico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrews A H (1982). Effects of glucose and propylene glycol on pregnancy toxemia in ewes. *Vet Rec* 110(4): 84-85.
2. Andrews A (1997). Pregnancy toxemia in the ewe. *In Practice* 19(6): 306-312.
3. Preece, A (1972). Paraffin tissue processing method. En: Preece A, *A manual for histologic technicians*, 3º ed. Boston , Little ,Brown. pp 57-73.
4. Bilheimer DW (1991). Clinical considerations regarding treatment of hypercholesterolemia in elderly. *Atherosclerosis*, S35-S39(abstract).
5. Bonino J, Sienna R, Sorondo L (1987). Enfermedades causadas por trastornos metabólicos: toxemia de la preñez. En: Bonino J, Durán del Campo A, Mari J,(ed.) *Enfermedades de los lanares II*. Montevideo, Hemisferio Sur. pp 239-265.
6. Brady PS, Marine KA, Brady LJ, Ramsay RR (1989). Co-ordinate induction of hepatic mitochondrial and peroxisomal carnitine acyl transferase synthesis by diet and drugs. *Biochem J* 260:93-100.
7. 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 A(2):255-257.
8. Buckrell B C (1988). Application of ultrasonography in reproduction in sheep and goats. *Theriogenology* 29:11-20.
9. Burt A D (2001). Steatosis and Steatohepatitis. *Curr Diag Pathol* 7:141-147.
10. 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.
11. Cal Pereyra, L; Borteiro C.; Benech A.; Rodas E.; Abreu M.N.; Cruz JC; González Montaña JR. (2009). Histopathological changes of the liver and metabolic correlates in ewes with pregnancy toxemia. *Arq Bras Med Vet Zoot*, 61(2):306-312.
12. Chilliard Y (1987). Variations qualitatives et métabolisme 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.

13. 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.
14. Cirio A, Tebot I. (2000) La lipomovilización durante el parto y la lactación. En: Cirio A, Tebot I (eds) *Fisiología metabólica de los rumiantes*. Fac Vet, pp 81-113.
15. 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.
16. Cruz J C, Cal Pereyra L, Abreu M N, Benech A, Borteiro C, Rodas E (2005). Biopsia hepática en ovinos: Modificación a la técnica de aspiración por aguja. *Veterinaria (Montevideo)* 40(159-160):15-17.
17. De Brito Gomes M (2006). Glitazonas e síndrome metabólica: mecanismos de ação, fisiopatología e indicações terapêuticas. *Arq Bras Endocrinol Metab* 50(2):271-280.
18. Desvergne B, Wahli W (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear Control of Metabolism. *Endoc Rev*, 20(5): 649-688.
19. Emery R S, Brown R W, Black A L (1967). Metabolism of DL-1,2-propanediol-2-14C in a lactating cow. *J Nutr* 92: 348-352.
20. Ford E J, Evans J, Robinson I (1990). Cortisol in pregnancy toxemia of sheep. *Brit Vet J* 146: 539-542.
21. Foxworthy PS, Perry DN, Hoover DM, Eacho PI (1990). Changes in hepatic lipid metabolites associated with lipid accumulation and its reversal in rat given the peroxisome proliferator LY171883. *Toxicol Appl Pharmacol* 106: 375-383.
22. Fromenty B, Pessayre D (1997). Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis. Effects of drugs, ethanol, hormones and cytokines. *J Hepat* 26(2):43-53.
23. 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, Rejas 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, pp 330-379.
24. González-Montaña J R, Rejas López J (1995). Toxemia de la Gestación. *Med Vet* 12(9):513-522.
25. González Montaña J R, Benech A, Da Silva S, Martín A, Borteiro C, Lataste V, Rodas E, Prieto Montaña F, Cal Pereyra L. (2008). Toxemia de la

gestación ovina: Posibles indicadores que permiten su diagnóstico subclínico. *Veterinaria (Montevideo)* 43(171):29(abstract).

26. Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD, Kelly DP (1994). The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:11012-11016.
27. Harmeyer J, Schlumbohm C (2006). Pregnancy impairs ketone body disposal in late gestating ewes: Implications for onset of pregnancy toxemia. *Res Vet Sci* 81(2):254-264.
28. Henze P, Bickhardt K, Fuhrmann H (1998). The contributions of the hormones insulin, cortisol, somatotropin and total estrogen to the pathogenesis of sheep ketosis. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 101(2):61-65.
29. Herdt, T H (1988). Fatty liver in dairy cows. *Vet Clin of North Am: Food Anim Practice* 4:269-287.
30. 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.
31. Hermes Toros X (2005). Farmacología do Fibratos. *Arq Bras Cardi* 85(5):15-16.
32. Kirby B (1991). Lipoprotein in the elderly. *Int Med Res* 19(2):164-180.
33. Koenig M V, Contreras P A (1984). Alteraciones del metabolismo energético en Rumiantes y sus principales manifestaciones clínicas. *Arch Med Vet* 16(1):7-13.

Latruffe N, Cherkaoui Malki M, Nicolas-Frances V, Jannin B, Clemencet M, Hansmannel F, Passilly-Degrace P, Berlot J (2001). Peroxisome-proliferator-activated receptors as physiological sensors of fatty acid metabolism: molecular regulation in peroxisomes. *Biochem Soc Trans* 29(2):305-309.
34. Manazza, J (2006). Manejo de carneros y ovejas en servicio "a campo". INTA EEA Balcarce, Argentina. Disponible en: www.produccion_animal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina88-manejo_carneros_y_ovejas_en_servicio.pdf. Fecha de consulta: 24/3/2013.
35. Marteniuk J V, Herdt T H (1988). Pregnancy toxemia and ketosis of ewes and does. *Vet Clin of North Am: Food Animal Pract* 4(2):307-315.
36. Martin W B, Enfermedades de las ovejas (2002). Zaragoza, Acribia, 648p.
37. Osmunsen H, Bremer J, Pedersen J L (1991). Metabolic aspects of peroxisomal betaoxidation. *Biochim Biophys Acta* 1085:141-148.
38. Radostits O M, Gay C C, Blood D C, Hinchcliff K W (2002). *Medicina Veterinaria Vol. II*, 9ª ed McGraw-Hill – Interamericana, pp 1724-1736.

39. Ranaweera A, Ford E J, Samad A R (1979). The effect of triamcinolone acetonide on plasma glucose and ketone concentration and the total entry rate of glucose in twin pregnant hypoglycaemic ketotic sheep. *Res Vet Sci* 26(1):12-16.
40. Reid I M (1980). Incidence and severity of fatty liver in dairy cows. *Vet Rec*, 107:281-284.
41. 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 mayo 1993. Salto, Uruguay. CD.ROM.
42. Rook J S (2000). Pregnancy toxemia of ewes, does, and beef cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 16(2):293-317.
43. 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.
44. Schütze-Segen (2----) Disponible en: www.schut-segen.com/site/node/43
Fecha de consulta: 24/03/2013.
45. Scott, P. (1995). Differential diagnosis of common metabolic disorders of sheep. In *Practice* 17 (6):266-269.
46. Sienra 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.
47. Sigurdsson H (1988b). Susceptibility to pregnancy disease in ewes and its relation to gestational diabetes. *Acta Vet Scand* 1988(29): 407-414
48. Steiner G (2005). Fibrates and coronary risk reduction. *Atherosclerosis* 182: 199–207.
50. Stockhaus C, Van Den Ingh T, Rothuizen J (2004). A multistep approach in the cytologic evaluation of liver biopsy samples of dogs with hepatic diseases. *Vet Pathol* 41:461-470
51. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM (1995). PPAR γ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 15: 351-357
52. Uauy R, Martínez J, Rojas C (2000). Nutrición molecular, papel del sistema PPAR en el metabolismo lipídico y su importancia en obesidad y diabetes mellitus. *Rev Méd Chile* 128: 4, 1-14.

53. Van Saun R J (2000). Pregnancy toxemia in a flock of sheep. *JAVMA* 217(10): 1536-1539.
54. 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.
55. Wierzbicki A S (2007). Peroxisomal disorders affecting phytanic acid alpha-oxidation: a review. *Biochem Soc Trans* 35(5): 881-886.