UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

SUBNUTRICIÓN GESTACIONAL EN OVEJAS PASTOREANDO CAMPO NATURAL: EFECTOS A LARGO PLAZO SOBRE LA COMPOSICION CORPORAL, EL PESO DE LOS ÓRGANOS, LA MASA E HISTOLOGÍA MUSCULAR EN LA PROGENIE FEMENINA.

por

AÑÓN FERME Victoria

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

MODALIDAD Ensayo experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY

2024

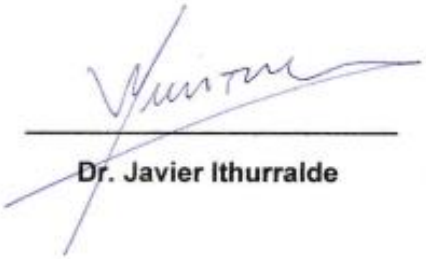
PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de Grado aprobada por:

Presidente de mesa

Dra. Raquel Pérez Clariget

Segundo Miembro



Dr. Javier Ithurralde

Tercer Miembro

Dra. Andrea Fernandez

Cuarto Miembro

Dra. Patricia Genovese

Autor

Victoria Añón Ferme

Fecha de aprobación: 27/12/2024

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Javier gracias por la paciencia y valiosos consejos a lo largo de todo el proceso. Y también a mi cotutora Patricia. Su experiencia y apoyo fueron fundamentales para llevar adelante esta tesis.

A Florencia Corrales, Alejandro Bielli, Raquel Pérez y Álvaro López, por su participación activa y colaboración en la implementación y realización del experimento. Su compromiso y disposición marcaron la diferencia.

A Facultad de Veterinaria, por los años de aprendizaje que allí viví, y a la Facultad de Agronomía y su personal, por cuidar de los animales durante tantos años y brindar un entorno propicio para la investigación.

A mi amiga y hermana Flor, sin su aliento y guía nada hubiese sido lo mismo, a Belén y Camila por todos estos años, a mis otras queridas amigas Clarisa, Lucía, Lucila, Stefa, Gime, Gaby y Ana, gracias por estar siempre a mi lado, acompañándome, alentándome y haciéndome sentir que nunca estoy sola.

A mi familia, por estar siempre presente, apoyándome en cada paso, en cada decisión y en cada momento, tanto en los buenos como en los difíciles. Este logro no sería posible sin ustedes.

Finalmente, a mis mascotas cony y arya por acompañarme.

Gracias a todos por ser parte de este camino tan especial.

Tabla de contenido

PÁGINA DE APROBACIÓN ..... **¡Error! Marcador no definido.**
AGRADECIMIENTOS 3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS 5
RESUMEN 7
SUMMARY 9
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 11
1.1. Programación Fetal 11
1.2. Mecanismos de Programación Fetal 12
1.3. Efectos diferenciales de programación fetal sobre el desarrollo de diferentes órganos 14
1.4. Desarrollo del tejido muscular estriado esquelético y efectos de programación fetal 16
1.5. Tejido muscular esquelético y diversidad fibrilar. Programación fetal e importancia para la salud y metabolismo animal 18
1.6. Tejido adiposo intramuscular, desarrollo, programación fetal e implicancias en el metabolismo animal 21
1.7. Efecto diferencial de la programación fetal dependiendo del tipo de gestación (único o mellizo) 23
2. HIPÓTESIS 25
3. OBJETIVOS 26
3.1. Objetivo General: 26
3.2. Objetivos específicos: 26
4. MATERIALES Y MÉTODOS 27
5. RESULTADOS 30
5.1. Efectos sobre las medidas morfométricas corporales 30
5.2. Efecto sobre el peso de la carcasa y los órganos 32
5.3. Efectos sobre el peso muscular 34
5.4. Efecto sobre la distribución de fibras musculares con diferentes niveles de PAS positividad 36
5.5. Efecto sobre la densidad y morfometría de los adipocitos del perimisio intramuscular 37
6. DISCUSIÓN 40
7. CONCLUSIONES 49
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 50

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Hipótesis de Barker 11

Figura 2. Representación de la circulación fetal 15

Figura 3 Etapas de la Miogénesis. 17

Figura 4. Esquema del desarrollo muscular fetal..... 22

Figura 5 Micrografías de cortes transversales de los músculos Gluteobiceps (A), Supraspinatus (B) y Semitendinosus (C) tratados con la técnica PAS 37

Figura 6 Micrografías de cortes transversales del músculo Semitendinosus (ST), de ovejas de los grupos BOF (A) y AOF (B) tratadas con la reacción histoquímica de PAS. 39

Cuadro 1. Valores promedio para las variables morfométricas en ovejas adultas nacidas de partos dobles o simples pertenecientes a ambos tratamientos (AOF y BOF) y valores promedio para las ovejas de los grupos AOF y BOF de ambos tipos de parto pooleados. 30

Cuadro 2. Valores promedio para variables morfométricas medidas en ovejas adultas de partos simples y dobles de los tratamientos AOF y BOF..... 31

Cuadro 3. P valores para los efectos principales tratamiento, tipo de parto y su interacción para los pesos de carcasa y órganos. 32

Cuadro 4. Valores promedio de los pesos (medias ± errores estándar de la media) para carcasa y órganos de ovejas adultas para los tratamientos AOF y BOF, de tipo de parto Simple y Doble y de ambos tipos de partos pooleados. 33

Cuadro 5. Pesos (medias ± errores estándar de la media) de los músculos GB, ST, SS y de los tres músculos pooleados en ovejas de los tratamientos AOF y BOF, de partos simples y dobles y de ambos tipos de parto pooleados..... 35

Cuadro 6. Porcentaje de fibras PAS leves, intensas e intermedias (medias ± errores estándar de la media) en los músculos GB, ST y SS de ovejas de los tratamientos AOF y BOF y de ambos tratamientos pooleados. 36

Cuadro 7. Diámetro de adipocitos, densidad adipocitaria y área de sección transversal adipocitaria (medias ± errores estándar de la media) en los músculos GB, ST y SS de ovejas de los grupos AOF y BOF y de ambos grupos pooleados. 38

Cuadro 8. Diámetro adipocitario (µm; medias ± errores estándar de la media) para los músculos GB, SS y ST según el tratamiento (AOF/BOF) y el tipo de parto (simple o doble). 39

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar los efectos a largo plazo de la subnutrición gestacional sobre la composición corporal, el peso de los órganos, la masa e histología muscular en ovejas. Se utilizaron 28 ovejas de raza Corriedale (20 de parto simple y 8 de parto doble) nacidas en la primavera del año 2013 y cuyas madres pastorearon desde 23 días antes de la concepción hasta el día 122 de gestación sobre dos ofertas contrastantes de campo natural: 1) Grupo alta oferta (AOF) pastorearon a 10-12 kg MS/100 kg de peso vivo (PV)/día y 2) Grupo baja oferta (BOF) pastorearon a 5-8 kg MS/100 kg PV/día. La progenie femenina objetivo de este trabajo fue criada, destetada y mantenida en una misma majada en igualdad de condiciones hasta los 7 años de edad, momento en el que se trasladaron para su faena. Previo a la faena se llevó a cabo el pesaje y toma de medidas corporales. Posteriormente se procedió a el pesaje de órganos (hígado, riñones, glándulas adrenales, corazón y tracto reproductor) y también a la disección y registro del peso de los siguientes músculos de las medias canales izquierdas: *Semitendinosus* (ST), *Gluteobiceps* (GB), y *Supraspinatus* (SS). Muestras de estos músculos se fijaron y congelaron para luego obtener cortes transversales que se trataron con la reacción histoquímica de PAS para realizar diferentes evaluaciones histológicas tanto del tejido muscular como del tejido adiposo intramuscular. La subnutrición gestacional no afectó el peso de los órganos evaluados con la excepción de los riñones (P = 0,02) que resultaron más pesados en los animales BOF (104,45 ± 5,20 g) en comparación al grupo AOF (88,84 ± 5,72 g). Se detectaron algunas interacciones entre el tratamiento y el tipo de parto para el peso de algunos órganos. Las ovejas de partos dobles del grupo AOF tuvieron corazones más livianos en comparación a las simples del mismo grupo (P = 0,02; 203,90 ± 4,22 y 245,63 ± 8,71 g, respectivamente). Las ovejas de parto doble del grupo BOF tendieron (P = 0,09) a tener adrenales más pesadas que el resto de los grupos. El peso muscular no fue afectado por el tratamiento nutricional de las madres (P= 0,19). No obstante, se detectó un efecto significativo para la interacción entre el tratamiento y el tipo de parto (P = 0,0188) que implicó que dentro de las ovejas AOF el tipo de parto doble produjo músculos más livianos, mientras que entre ovejas BOF no existió diferencias en el peso muscular de ovejas simples y dobles. El tratamiento no afectó los porcentajes de fibras musculares con diferentes niveles de PAS positividad (P≥ 0,53). El tratamiento tampoco afectó ninguna de las variables medidas en los adipocitos intramusculares (P ≥ 0,18). Sin embargo, se detectó una tendencia (P = 0,0518) a que la densidad adipocitaria fuera afectada por la interacción entre el tratamiento y el tipo de músculo de forma tal que se observó que el tratamiento de subnutrición aumentó la densidad adipocitaria solo en el músculo ST (P = 0,014) mientras que en los otros músculos no hubo diferencias en la densidad adipocitaria entre animales BOF y AOF (P ≥ 0,59). El diámetro adipocitario fue afectado por la interacción entre tratamiento y músculo (P = 0,0467) de forma tal que la subnutrición de las madres redujo el diámetro adipocitario solo en el músculo ST (P = 0,008) mientras que en los demás músculos no hubo efecto del tratamiento para esta misma variable (P ≥ 0,86). A su vez, también hubo una tendencia (P = 0,0630) a que las áreas de sección transversal adipocitarias estuvieran afectadas por la interacción entre el tratamiento y el músculo, de forma tal que el tratamiento nutricional redujo el área de sección transversal adipocitaria en músculo ST (P = 0,010), en tanto que no produjo ningún efecto en los músculos SS ni GB (P ≥

0,91). Por otra parte, el diámetro de los adipocitos tendió a estar afectado por la triple interacción entre tratamiento, músculo y tipo de parto (P= 0,066). Dentro de los animales de AOF el parto doble no afectó el diámetro adipocitario en los músculos GB y SS (P≥ 0,22), mientras que en el ST lo aumentó significativamente (P = 0,02). Por otra parte, dentro de los animales BOF el parto doble no produjo efecto sobre el diámetro adipocitario en ninguno de los músculos evaluados (P ≥ 0,32). En conclusión, la subnutrición materna indujo efectos a largo plazo sobre la masa y la histología muscular que podrían repercutir en diferentes niveles de la salud animal siendo importante destacar que la mayoría de estos efectos parecen depender tanto del tipo de parto o gestación como del músculo en el que se los evalúe.

SUMMARY

The aim of the present study was to examine the long-term effects of gestational undernutrition on body composition, organ weight, muscle mass, and histology in sheep. Twenty-eight Corridale sheep (20 single births and 8 twins) born in spring 2013 were used. Their mothers grazed from 23 days before conception until day 122 of gestation on two contrasting natural pasture conditions: 1) High Pasture allowance (HPA), grazing at 10-12 kg dry matter (DM)/100 kg body weight (BW)/day, and 2) Low Pasture allowance (LPA), grazing at 5-8 kg DM/100 kg BW/day. The female offspring studied were raised, weaned, and maintained in the same flock under the same conditions until the age of 7, at which point they were transferred for slaughter. Prior to slaughter, weighing and body measurements were taken. Subsequently, organ weights (liver, kidneys, adrenal glands, heart, and reproductive tract) were recorded, and the following muscles from the left half-carcasses were dissected and weighed: *Semitendinosus* (ST), *Gluteobiceps* (GB), and *Supraspinatus* (SS). These sampled muscles were fixed and frozen, and cross-sections were then obtained and treated with the PAS histochemical reaction to perform histological evaluations of both muscle tissue and intramuscular adipose tissue. Gestational undernutrition did not affect the weights of the evaluated organs, except for the kidneys ($P = 0.02$), which were heavier in the LPA animals (104.45 ± 5.20) compared to the HPA group (88.84 ± 5.72). Some interactions between treatment and birth type were detected for the weight of certain organs. HPA twin sheep had lighter hearts than single-borns in the same group ($P = 0.02$, 203.90 ± 4.22 and 245.63 ± 8.71, respectively). LPA twin sheep tended ($P = 0.09$) to have heavier adrenal glands than the rest of the groups. Muscle weight was not affected by the mothers' nutritional treatment ($P = 0.19$). However, a significant interaction effect was detected between treatment and birth type ($P = 0.0188$), implying that among HPA sheep, twins had lighter muscles, while among LPA sheep, there was no difference in muscle weight between singles and twins.
The treatment did not affect the percentages of muscle fibers with varying PAS positivity levels ($P \geq 0.53$) or any of the variables measured in intramuscular adipocytes ($P \geq 0.18$). However, a trend was observed ($P = 0.0518$) suggesting that adipocyte density was affected by the interaction between treatment and muscle type, showing that undernutrition increased adipocyte density only in the ST muscle ($P = 0.014$), with no differences in adipocyte density among other muscles between LPA and HPA animals ($P \geq 0.59$). Adipocyte diameter was affected by the interaction between treatment and muscle ($P = 0.0467$), with maternal nutritional treatment reducing adipocyte diameter only in the ST muscle ($P = 0.008$), while in other muscles, no treatment effect was observed for this variable ($P \geq 0.86$). Additionally, a trend ($P = 0.0630$) was observed for cross-sectional adipocyte areas to be affected by the interaction between treatment and muscle, with maternal subnutrition reducing adipocyte cross sectional area in the ST muscle ($P = 0.010$) but having no effect in the SS and GB muscles ($P \geq 0.91$). Furthermore, adipocyte diameter tended to be affected by a three-way interaction between treatment, muscle, and birth type ($P=0.066$). In HPA animals, twin births did not affect adipocyte diameter in any of the evaluated muscles ($P \geq 0.32$)

In conclusion, maternal undernutrition induced long-term effects on muscle mass and histology, which could impact various levels of animal health. It is important to note that most of these effects appear to depend on both the birth type and the specific muscle being evaluated.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Programación Fetal

El concepto de programación fetal fue desarrollado por el epidemiólogo inglés David Barker quien planteó que ciertos trastornos de la vida adulta pueden deberse a afecciones sucedidas en el ambiente intrauterino durante el desarrollo prenatal de esos individuos. Este concepto tiene su origen en estudios epidemiológicos llevados a cabo en humanos que indicaron que ciertas enfermedades cardiovasculares y metabólicas (Figura 1) podían estar vinculadas con la pobre nutrición materna en la etapa prenatal (Barker & Osmond, 1986). A partir de allí se ha establecido que enfermedades tales como la hipertensión, diabetes mellitus tipo II, dislipemias y enfermedades coronarias pueden deber su origen a un periodo de subnutrición materna durante el desarrollo fetal (Barker, 2002; De Boo & Harding, 2006; Zandi-Nejad et al., 2006).

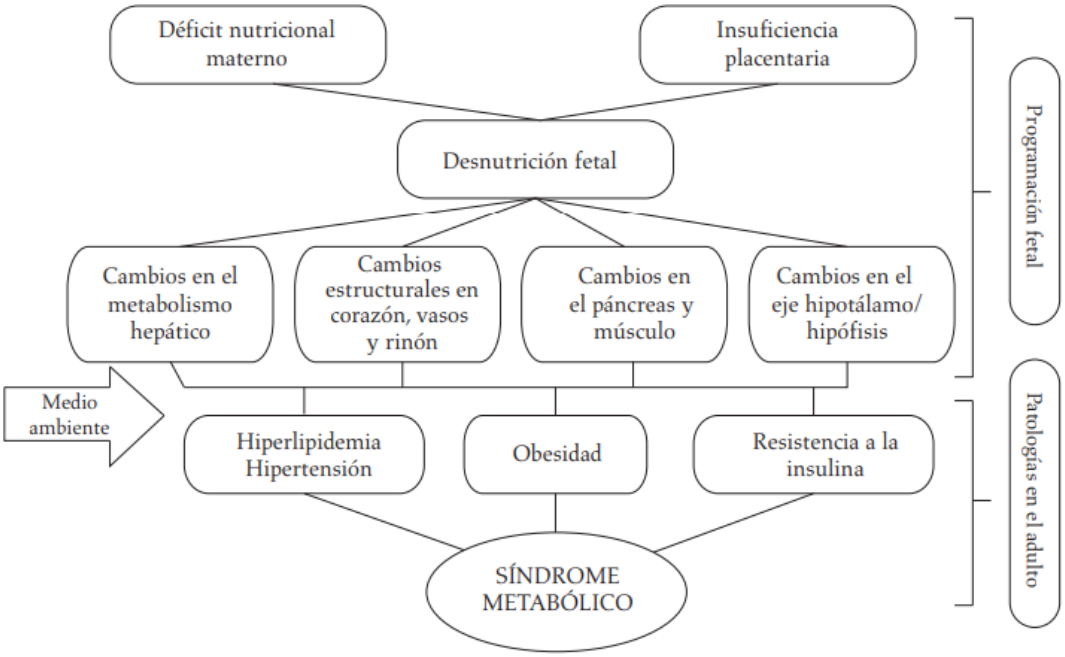


Figura 1. Hipótesis de Barker (Fuente: García et al., 2012)

Podemos decir entonces que la teoría de la programación fetal se basa en el hecho de que existen periodos específicos del desarrollo en los cuáles los organismos resultan permeables o especialmente susceptibles a diferentes condiciones del entorno. Cuando un feto se enfrenta a una situación de subnutrición se desencadenarán una serie de procesos que alterarán la estructura y función de sus órganos con el objetivo de mantener el desarrollo de sus funciones vitales permitiendo la sobrevivencia. A medida que el tiempo pasa, la respuesta a los desafíos se vuelte limitada. Este fenómeno conocido como programación fetal refiere a que estímulos, cuando son aplicados durante el desarrollo temprano de un individuo generarán en él cambios permanentes que se manifestarán en la etapa adulta (Calkins & Devaskar,

2011). Pese a que los mecanismos implicados en la programación fetal son diversos, en general se ha propuesto que los efectos ambientales prenatales alteran las rutas fisiológicas para dotar al individuo de mejores herramientas de sobrevida bajo condiciones ambientales negativas. Según Hales y Barker (1992) los individuos mal nutridos prenatalmente se adaptan fisiológicamente mejor a las condiciones de mala nutrición, pero, sin embargo, cuando se enfrentan a condiciones nutricionales favorables en la vida adulta, dichas adaptaciones los predisponen a contraer enfermedades metabólicas. Esto se conoce como el fenotipo ahorrativo; animales programados para la escasez que se enferman al enfrentarse a condiciones nutricionales favorables.

1.2. Mecanismos de Programación Fetal

Los mecanismos involucrados en los efectos de programación fetal son diversos y altamente complejos, incluyendo alteraciones en el intercambio de nutrientes entre madre y feto (estructura y función placentaria, cambios hemodinámicos en el flujo sanguíneo feto placentario) así como alteraciones específicas en los procesos ontogénicos de los diferentes órganos, tejidos y/o tipos celulares (Ithurralde, 2022). Es clave reconocer que cuando nos referimos a los efectos específicos de programación fetal sobre ciertos tejidos o tipos celulares particulares, se debe considerar que gran parte de esos efectos estarán determinados por las dinámicas de desarrollo de dichos tejidos o células (Ithurralde, 2022). Durante el desarrollo embrionario y fetal existen ciertos periodos donde algunos órganos pueden ser más o menos sensibles a las injurias provocadas por un ambiente materno desfavorable. En términos celulares o histológicos, se puede decir que los efectos nocivos ambientales afectarán los procesos de proliferación o mitosis (hiperplasia) celular, así como también los procesos de maduración funcional y crecimiento (hipertrofia) celular (Sallout & Walker, 2003). Estos efectos sobre el desarrollo de los órganos son los que terminan aumentando la probabilidad de presentar ciertas patologías en la vida adulta, estimándose que en los seres humanos un 50% de las enfermedades metabólicas del adulto tienen su origen en la etapa de desarrollo fetal (Vo & Hardy, 2012). Es así entonces que el feto necesita un ambiente y una nutrición acorde a sus requerimientos para un desarrollo pleno de su organismo siendo que cualquier situación que haga variar ese equilibrio podría alterar tal desarrollo (Snoeck et al., 1990). En general se acepta que existen diversos factores ambientales que son capaces de inducir efectos de programación fetal siendo los de tipo nutricional los más estudiados y altamente relacionados con la inducción de efectos permanentes en el crecimiento, el metabolismo y los procesos patológicos futuros (Sinclair et al., 2007). En ese sentido, existen múltiples trabajos que han demostrado que las condiciones nutricionales alteradas durante el desarrollo prenatal son capaces de impactar en la hiperplasia celular a nivel de diferentes órganos y/o tejidos. A modo de ejemplo, una inadecuada nutrición en ratas gestantes a las que se las sometió a una dieta hipocalórica y baja en proteínas produjo efectos negativos en el desarrollo hiperplásico de las células beta del páncreas y en el tamaño de los islotes (Snoeck et al, 1990). También se ha

observado que una subnutrición materna es capaz de reducir la cantidad de células de Sertoli testiculares tanto en ovinos (Bielli et al., 2002) como en roedores de laboratorio (Genovese et al., 2009). Otro ejemplo de efectos de programación fetal por subnutrición sobre la hiperplasia celular ha sido demostrado por Ithurralde et al. (2020) quienes reportaron que la subnutrición de ovejas gestantes reduce la hiperplasia de las células mioprogenitoras repercutiendo en la formación de músculos con un menor número de células. No está de más agregar también que además de la subnutrición, otras situaciones ambientales negativas tales como el consumo de alcohol por parte de la madre gestante pueden generar efectos de programación fetal, trayendo como consecuencia un incremento en el riesgo durante la niñez de sufrir patologías neurológicas y patologías asociadas al síndrome de alcoholismo fetal (Legault et al, 2018).

Por otra parte, además de los efectos específicos sobre la hiperplasia celular y el desarrollo de los tipos celulares y tejidos, gran parte de los efectos de programación fetal han sido relacionados con cambios en el desarrollo y la función placentaria (Godfrey, 2002; Jansson et al., 2007; Myatt, 2006,). Es de gran importancia recordar los diversos roles que cumple la placenta tales como el transporte de nutrientes y productos de desechos entre madre y feto, la protección de la respuesta inmune materna y el oficiar como fuente de hormonas peptídicas y esteroideas que influyen en el metabolismo materno, fetal y placentario (Myatt, 2006). Entre los aspectos placentarios que se pueden ver alterados en situaciones de programación fetal se encuentran la abundancia y/o actividad de transportadores de nutrientes específicos entre los que se destacan los de aminoácidos y también el desarrollo y la función de los componentes vasculares placentarios (Jansson et al., 2007; Todros et al., 1999). Por esta razón se ha propuesto que una injuria en el entorno materno causará una alteración placentaria tanto a nivel estructural como de su función, la cual probablemente juegue un papel importante en el desarrollo del individuo afectándolo por ejemplo en su desarrollo neurológico fetal. Esto se debe a que la placenta participa en rutas metabólicas que modulan el desarrollo del cerebro fetal y su alteración podría incluso explicar el origen de ciertos trastornos de tipo psiquiátricos (Faa et al, 2016).

A su vez, desde el punto de vista molecular los mecanismos que reciben mayor atención en cuanto a ser considerados como posibles causantes de los efectos de programación fetal son los denominados mecanismos epigenéticos. Según Vo y Hardy (2012), si bien es la genética tradicional lo que va a hacer que una persona este más o menos propensa a sufrir una enfermedad heredable, es la epigenética y el ambiente lo que determinarán el resultado de la misma, de forma tal que a través de diferentes mecanismos la epigenética interviene en la programación a nivel celular en el individuo. Concretamente los mecanismos epigenéticos comprenden una serie de modificaciones químicas sobre el ADN y las proteínas que actúan junto a este, las cuales van a regular la expresión de los genes a corto y sobre todo a largo plazo sin modificar el código genético individual (Casanello et al., 2015).

1.3. Efectos diferenciales de programación fetal sobre el desarrollo de diferentes órganos

Los efectos ambientales adversos durante el desarrollo temprano inciden en el desarrollo de los tejidos y órganos alterando su función. No obstante, los efectos pueden ser diferentes dependiendo de varios factores tales como el momento en el que ocurre la subnutrición y la dinámica temporal de desarrollo de cada tejido o cada órgano. A su vez, se ha establecido que ante situaciones restrictivas diversos órganos pueden verse afectados de forma diferencial por causa de mecanismos de priorización en la distribución de nutrientes y/o oxígeno, o bien debido a susceptibilidades diferentes de los distintos órganos a la carencia de nutrientes. Es así que Barker y Hanson (2004) sostienen que mientras el feto va desarrollándose y se ve expuesto a efectos adversos, se lleva a cabo una redistribución sanguínea cuyo objetivo primordial es proteger el cerebro, pero al mismo tiempo limita el desarrollo de otros órganos tales como el hígado o los riñones. Esto se conoce como la teoría del dilema fetal, que plantea que ante situaciones restrictivas los fetos responden con una redistribución sanguínea que tiene como objetivo proteger al cerebro, pero que a su vez compromete y limita el desarrollo de otros órganos como los riñones y el hígado, siendo los mecanismos implicados en la redistribución sanguínea complejos e implicando la acción de hormonas, así como los cambios que enfrentaran los órganos fetales como consecuencia a la acción de sustancias vasoconstrictoras como las catecolaminas, arginina-vasopresina, endotelina y el óxido nítrico (Barker & Hanson, 2004; Nathanielsz & Hanson, 2003). Al mismo tiempo, la redistribución del flujo de sangre hacia los órganos prioritarios también se explica por la presencia de ciertas estructuras vasculares especiales que permiten el bypass o pasaje selectivo de distintas partes de la circulación placentaria y fetal (Figura 2). Estas estructuras son el foramen oval, el conducto arterioso y los ductos venosos. Por ejemplo, los ductos venosos fetales corresponden a un shunt o anastomosis única que permite el paso directo de sangre bien oxigenada desde la vena umbilical a la circulación coronaria y cerebral, a través de un paso preferencial por el foramen oval (Pérez-Pedregosa et al., 2014). Se ha propuesto que, ante situaciones restrictivas, sobre todo de hipoxia fetal, el nivel de apertura de esta anastomosis varía, modificando así la cantidad de sangre, nutrientes y oxígeno que llegan a los diferentes órganos fetales. Por ejemplo, Tchirikov et al. (2003) propusieron que las catecolaminas son capaces de generar comparativamente mayor nivel de vasoconstricción en las venas intrahepáticas que en los ductos venosos, lo que genera que el flujo sanguíneo fetal se redistribuya reduciendo el pasaje de sangre por el hígado y favoreciendo el flujo hacia el sistema nervioso central.

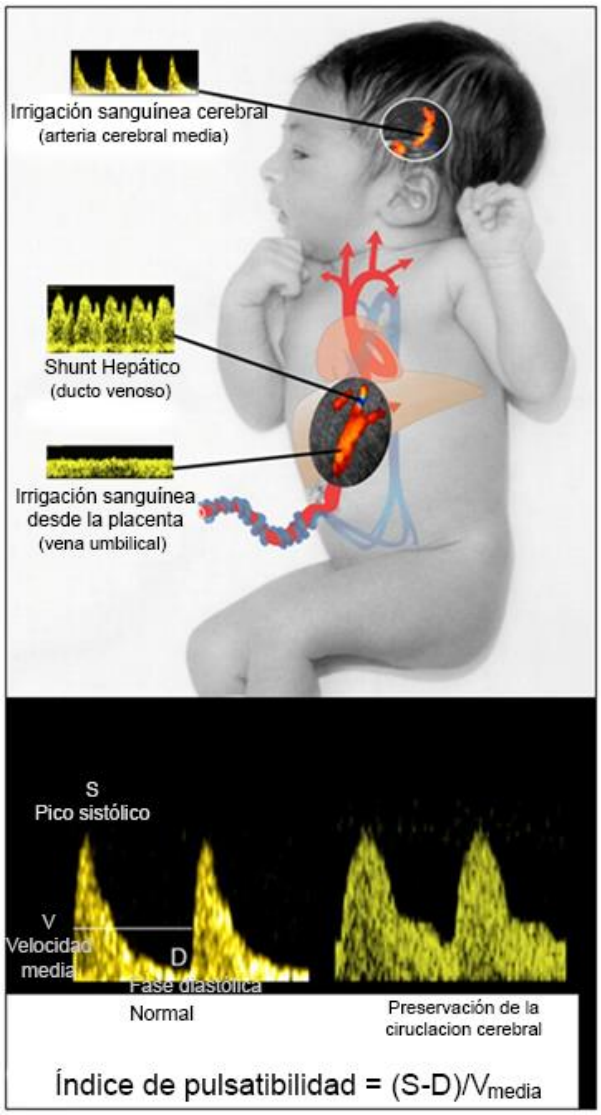


Figura 2. Representación de la circulación fetal, se observa la circulación sanguínea del hígado y el cerebro fetal. (A) La sangre rica en nutrientes proveniente de la placenta viaja a través de la vena umbilical y perfunde el hígado fetal o lo evita a través de una derivación del conducto venoso (shunt). (B) La preservación de la circulación cerebral o “Brain-sparing" está asociada con la vasodilatación del mismo, alterando la velocidad de onda del flujo sanguíneo en la arteria cerebral media, y por lo tanto disminuyendo el índice de pulsatilidad (Adaptado de Godfrey et al, 2012).

Estos mecanismos de redistribución del flujo sanguíneo, oxígeno y nutrientes hacia algunos órganos por sobre otros, conjuntamente con las dinámicas temporales de desarrollo y las prioridades en cuanto a partición de nutrientes, han llevado a que se proponga que ante situaciones de restricción nutricional los individuos no ven afectados todos sus órganos de igual manera. Esto fue comprobado a nivel nacional por Abud et al. (2020) quienes evaluaron el efecto de dos ofertas de forraje diferentes en ovejas gestantes desde 23 dias previos a la concepción hasta los 70 o 122 días de gestación demostrando que la subnutrición materna afecta de forma distinta el peso de los diferentes órganos en fetos de 70 días y corderos neonatos. Estos autores

sugieren una jerarquización en cuanto a qué órganos fueron más o menos desarrollados, siendo los más importantes el corazón y el sistema nervioso central, seguidos con una importancia intermedia los órganos metabólicos (adrenales, riñones, hígado), y encontrando menos priorizados, y por tanto con una jerarquía menor los testículos y los genitales externos junto con los músculos esqueléticos de la carcasa. Esto es consistente con trabajos anteriores como el de Gao et al. (2009) quienes reportan que aquellos corderos gestados por madres restringidas nutricionalmente experimentaron un retraso en el crecimiento. Este retraso fue caracterizado por el hecho de que aquellos órganos de desarrollo temprano como el cerebro tuvieron alta prioridad en la división de nutrientes y por lo tanto se vieron menos afectados, a diferencia de órganos de desarrollo más tardío como pulmones, hígado y bazo, los cuales fueron más afectados por la subnutrición gestacional. Resultados similares fueron reportados por Desai et al. (1996) quienes estudiaron como afectaría una dieta hipocalórica baja en proteínas a las crías de ratones al día 21 de nacidos, y comprobaron que aquellos ratones hijos de madres con una dieta restringida exhibieron un 35% menos de peso al nacer que el grupo proveniente de madres no restringidas, pero además evidenciaron un crecimiento selectivo o diferencial en relación al peso corporal de diferentes órganos como el cerebro y los pulmones (los menos afectados), o el páncreas, bazo, músculos e hígado (los que tendieron a pesar menos en relación al peso corporal).

1.4. Desarrollo del tejido muscular estriado esquelético y efectos de programación fetal

La miogénesis es el proceso por el cual se desarrollan las células musculares. Este proceso parte de mioblastos que son células mononucleadas e indiferenciadas que irán proliferando, fusionándose y finalmente diferenciándose en fibras musculares (Picard et al., 2002). Los mioblastos a su vez provienen de células mesenquimales pluripotenciales (Pittenger et al., 1999) y surgen del mesodermo embrionario, específicamente del dermomiótomo (Picard et al., 2002). Es así que durante la miogénesis los mioblastos atravesarán varias etapas, partiendo por la proliferación donde aumentan su número gracias a la mitosis celular, para luego fusionarse entre sí y formar una nueva estructura celular multinucleada que perderá permanentemente la capacidad de mitosis o división celular (Swatland, 1984). Esta fase es denominada etapa de desarrollo hiperplásico muscular y en esta aún hay mioblastos activos y por lo tanto no fusionados con capacidad mitótica. Luego el desarrollo muscular avanza gracias a procesos hipertróficos caracterizados por un aumento en diámetro y longitud de las células musculares, pero sin un aumento en la cantidad de las células que lo conforman (Swatland, 1984). Es importante establecer aquellos momentos del desarrollo fetal donde se producen estas etapas para saber que tan afectado podría verse el desarrollo muscular si la madre se viese sujeta a diferentes injurias como podría ser una nutrición deficiente. En la especie ovina la fase hiperplásica miogénica sucede hasta el día 70-85 del desarrollo intrauterino aproximadamente (Fahey et al., 2005; Wilson et al., 1992) y es aquí entonces donde se establece el número de fibras musculares que tendrá el animal durante su vida adulta. Se ha estudiado que, en la mayoría de las especies productivas, incluido el ovino la fase hiperplásica de la

miogénesis se desarrolla a su vez en dos etapas, siendo estas las denominadas miogénesis primaria y miogénesis secundaria. La miogénesis primaria es la que ocurre más temprano en el desarrollo fetal y durante la cual la fusión de mioblastos primarios da origen a una primera generación de precursores multinucleados llamados miotubos primarios; mientras que la miogénesis secundaria hace alusión a la formación de la segunda generación de precursores multinucleados llamados fibras fetales secundarias que se formaran de mioblastos más tardíos (Picard et al., 2002; Swatland., 1984;). La importancia de reconocer estas dos generaciones de mioblastos y de precursores de fibras maduras radica en que las mismas tienen susceptibilidades distintas a la programación fetal; las fibras secundarias (producto de la miogénesis secundaria) son las más sensibles a la programación fetal (Picard et al., 2002). A su vez, es importante reconocer también que las fibras formadas durante la miogénesis secundaria son las que más influencia van a tener sobre la futura masa muscular del animal adulto (Picard et al., 2002), de forma tal que su formación resultará clave para las características tanto en masa como en función de los músculos cuando el individuo sea adulto.

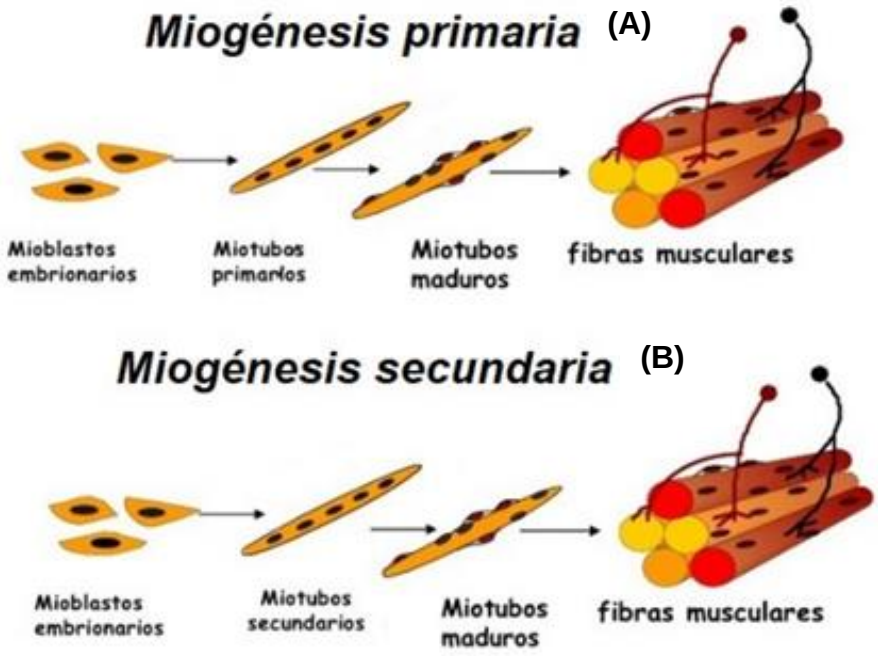


Figura 3 Etapas de la Miogénesis. Fuente (Adaptado de Casas., 2009). En ovinos los miotubos primarios (A) se forman entre los días 32-38 de gestación y las fibras fetales secundarias (B) se forman entre los días 38 y 76 de gestación (Wilson et al., 1992)

La programación fetal del músculo esquelético ha recibido mucha atención de los investigadores no solo por la importancia del músculo en si misma sino también por el hecho de que los músculos parecen ser especialmente sensibles a los efectos ambientales negativos durante su desarrollo. Como se comentó antes, los músculos pueden ser poco priorizados en comparación con otros órganos y esa es una causa importante de los efectos más marcados que padecen los músculos en relación a otros

órganos. Pero a su vez, gran parte de la explicación de por qué el músculo padece más los efectos de programación fetal pasa por su dinámica temporal de desarrollo prenatal. El músculo estriado esquelético es especialmente sensible a los efectos de programación fetal dado que, como se comentó antes, su desarrollo hiperplásico (determinación del número total de células que lo constituirá) ocurre temprano en la gestación (Picar et al., 2002) y porque además es un tejido poco priorizado en la partición de nutrientes ante situaciones restrictivas (Abud et al., 2020; Bauman et al., 1982; Close & Pettigrew, 1990). Nuestro equipo ha recientemente demostrado que la subnutrición gestacional reduce la cantidad de células formadas en la etapa miogénica secundaria fetal (Ithurralde et al., 2020), reduce la masa muscular y produce cambios morfológicos y fisiológicos en las poblaciones celulares musculares evidenciables tanto al nacimiento (Ithurralde et al., 2023) como a los 200 días de vida en corderos (Ithurralde et al., 2021). No obstante, hasta donde sabemos no existen trabajos que hayan evaluado los efectos de programación fetal sobre la masa y la histología muscular en ovejas adultas de edades avanzadas.

1.5. Tejido muscular esquelético y diversidad fibrilar. Programación fetal e importancia para la salud y metabolismo animal

El tejido muscular esquelético está conformado principalmente por células llamadas fibras musculares consideradas la unidad estructural y funcional muscular, que ocupan un 75-90% del volumen muscular total, y que constituyen el tejido contráctil, siendo además quienes definen la masa muscular de los animales (Lee et al., 2010). Las fibras musculares estriadas son células especializadas; sincitios multinucleados de gran diámetro y longitud, muy diferenciados y especializados para el trabajo contráctil, pero que exhiben una importante diversidad fibrilar dentro de cada músculo. Es así que Lefaucheur y Gerrard (2000) clasifican a las fibras musculares estriadas según dos criterios: sus características contráctiles y sus características metabólicas. La división de las células musculares en función de su perfil contráctil se refiere a que las células pueden estar mejor o peor adaptadas para realizar contracciones más o menos veloces y esto está definido por el polimorfismo de la cadena pesada de miosina (MyHC) (Maccatrozzo et al., 2004). De esta forma las fibras de contracción lenta contienen MyHC de tipo I y se asocian más al mantenimiento de la postura porque se requieren contracciones más lentas y sostenidas en el tiempo, mientras que las fibras de contracción rápida contienen MyHC de tipo II y se asocian a la producción de movimientos más intensos y breves (Lefaucheur & Gerrard, 2000). Cuando nos referimos a las características metabólicas de las fibras musculares hablamos de que estas células pueden estar mejor o peor adaptadas para obtener la energía que se utilizara en la contracción por un metabolismo predominantemente aeróbico oxidativo o por un metabolismo anaeróbico glucolítico. De ese modo existen fibras de tipo oxidativas que utilizan tanto la glucosa como los lípidos como fuente de energía y que por lo tanto tienen una actividad predominantemente aeróbica y las fibras glicoliticas que poseen mayores reservas de glucógeno y por lo tanto una actividad predominantemente anaeróbica. Además, existe un tipo de fibra denominada intermedia que no presenta ningún tipo de predominio por la fuente de energía utilizada (Graziotti et al., 2000).

Entre las metodologías disponibles para identificar los tipos de fibras existen métodos histoquímicos, inmunohistoquímicos y también bioquímicos y moleculares (Ithurralde, 2015). La tinción del ácido peryódico de Schiff o PAS es un método histoquímico ampliamente utilizado para la coloración de hidratos de carbono cuyo fundamento se basa en el hecho de que los anillos de las hexosas (carbohidratos) poseen carbonos adyacentes, cada uno de ellos con un grupo hidroxilo (–OH); el ácido peryódico rompe la unión entre estos átomos de carbono adyacentes y forma grupos aldehído que reaccionan con el reactivo de Schiff para dar un color rojo-púrpura distintivo (Mendoza & Guzmán, 2018). Así, La reacción del PAS tiñe carbohidratos y macromoléculas con abundancia de carbohidratos. La tinición de PAS se usa para detectar glucógeno en las células, moco en varios tipos de células y tejidos, la membrana basal que se encuentra debajo de los epitelios y las fibras reticulares del tejido conjuntivo (Ross & Wojciech, 2008).

En cuanto a su utilización para definir tipos fibrilares, si bien la tinción de PAS no es específica para definir tipos contráctiles y/o metabólicos de fibras, dado que permite identificar los niveles de glucógeno fibrilares, y considerando las diferencias que existen entre diferentes tipos de fibra en sus capacidades para almacenar y/o degradar glucógeno, se la puede considerar como una técnica indirectamente relacionada al perfil metabólico fibrilar (Swatland, 1975).
Es importante mencionar que existen otras diferencias tanto fisiológicas como morfológicas entre las células musculares que van más allá de las diferencias contráctiles y metabólicas y que entre otras incluyen por ejemplo: diferencias a nivel del desarrollo del retículo sarcoplásmico, actividad ATPásica, nivel de vascularización, diámetro o tamaño fibrilar, numero o tamaño de mitocondrias, contenido de lípidos y mioglobina, capacidad buffer y en la resistencia a la fatiga (Lefaucheur, 2010). Es importante también resaltar que los tipos fibrilares son considerados un aspecto relevante para el crecimiento y desempeño de los animales en los sistemas productivos, de forma tal que las fibras rápidas y glicolíticas tienen mayores diámetros promedio y mayores potenciales hipertróficos de forma tal que en los animales productivos se establece que un incremento de las mismas podría favorecer la masa muscular total (Lefaucheur & Gerrard, 2000). A su vez, dada la relevancia que tienen las diferentes fibras musculares para la producción, pero también para la fisiología y el metabolismo animal es que varios autores han estudiado como se ve afectada la composición fibrilar por la programación fetal. Esto se debe en términos generales al hecho de que una subnutrición materna no solo se va a incidir en la formación de células musculares, sino que también puede repercutir en los procesos de diferenciación funcional y morfológica de las mismas (Ithurralde, 2022). Es así entonces que partiendo de esta premisa y sabiendo que la subnutrición prenatal afecta en mayor medida a la formación de fibras secundarias (Lefaucheur & Gerrard, 2000; Picard et al, 2002) y que estas se diferencian en mayor medida a fibras de contracción rápida y metabolismo glicolítico, seria esperable que animales que hubieran padecido restricciones intrauterinas presentaran músculos con menor número de fibras de este tipo. No obstante, esto no siempre ocurre así, y de hecho existe una gran variabilidad en cuanto a los efectos observados por causa de programación fetal sobre la composición fibrilar de diversos músculos. Una de las posibles explicaciones para tal controversia probablemente pase por el hecho de que los cambios observados

puedan depender del tipo de músculo, así como también del momento del desarrollo o a la edad en los que son evaluados (Ithurralde, 2022). Un ejemplo de ello es el trabajo llevado a cabo por Wang et al, (2011) quienes reportaron que dietas altas en proteínas ofrecidas a cerdas gestantes produjeron al destete músculos más pesados y con mayor nivel de MyHC tipo II (mayor cantidad de fibras de contracción rápida) aunque curiosamente cuando la progenie se estudió a edades más avanzadas (previo a la faena) se observaron cambios opuestos con mayores proporciones de fibras tipo I y una reducción de MyHC de contracción rápida. Muchos otros trabajos han reportado cambios fibrilares por efectos de programación fetal en distintas especies y momentos del desarrollo, también con algunos resultados contradictorios. Se ha reportado que la subnutrición gestacional induce un aumento en la cantidad de fibras de contracción lenta y metabolismo oxidativo en músculos de neonatos ovinos (Fahey et al., 2005), neonatos suinos (Bauer et al., 2000; 2003) y fetos caprinos (Zhou et al., 2021). La presencia de mayor cantidad de fibras lentas y oxidativas en animales que padecieron subnutrición durante su desarrollo prenatal ha sido reportada también en corderos de entre 5 y 7 meses (Ithurralde et al., 2021; Piaggio et al., 2018; Tygesen et al., 2007), así como en conejos en edad de destete (Zotte et al., 2005) y en ratas de 25 a 90 días de vida (Toscano et al., 2008). No obstante, otro grupo de trabajos ha reportado resultados que de algún modo son opuestos a los antes resumidos y que indican que los músculos de animales que padecieron RCIU serían más rápidos y glicolíticos con menor capacidad oxidativa. En corderos recién nacidos, Reed et al. (2014) reportaron que la subnutrición materna aumenta la presencia de fibras rápidas en el *Semitendinosus*. Algo similar reportaron en bovinos Costa et al. (2021), indicando que menores niveles proteicos durante la gestación media tienden a aumentar la expresión de MyHC tipo IIX en los músculos de terneros de 30 días de vida. En animales de edad más avanzada Zhu et al. (2006), reportaron que la subnutrición materna aumenta la expresión de la isoforma IIB de MyHC en el *Longissimus* de corderos de ocho meses de vida. De forma similar Daniel et al. (2007), reportaron que una menor nutrición materna aumentó el número de fibras rápidas en el *Longissimus* de corderos de más de 4 meses de edad.

Como se comentó antes, los tipos fibrilares y los eventuales efectos de programación fetal sobre la miogénesis han sido un tema de mucho interés por parte de la comunidad científica. Mucho de ello se debe a que el músculo no solamente es relevante para la producción animal desde la perspectiva de la producción de carne, sino que además cumple funciones importantes en el metabolismo y la salud general de los individuos. Los músculos estriados se encuentran implicados en el mantenimiento de la postura, respiración, locomoción y además son un importante reservorio de nutrientes con la capacidad de actuar como reguladores metabólicos. Es así que el deterioro del músculo esquelético en adultos mayores trae apareados diversos e importantes problemas de salud; por ejemplo, se ha observado cada vez más y con mayor preocupación un aumento en la prevalencia de enfermedades relacionadas a la pérdida de masa muscular en la edad adulta como lo es la sarcopenia (Mcleod at al., 2016). La sarcopenia es una enfermedad multifactorial cuya incidencia está determinada por ciertos factores como la disminución en la actividad física, disminución en el consumo de alimento, aumento de fibrosis, cambios en el metabolismo muscular, inflamación crónica, stress oxidativo y una degeneración en la

unión neuro muscular (Papadopoulou., 2020). A su vez, es muy interesante destacar que ciertos estudios han propuesto que la sarcopenia puede ser una consecuencia no solo del proceso de envejecimiento normal sino deberse a injurias durante la vida fetal. Tanto es así que estudios realizados anteriormente por Patel et al. (2010) muestran que un ambiente intrauterino hostil que da por resultado un feto con bajo peso al nacer estaría asociado en hombres adultos a una disminución de la cantidad de fibras musculares y a una mayor predisposición a la sarcopenia.

A su vez, el músculo esquelético es un órgano clave desde el punto de vista metabólico al ser el principal sitio de captación de glucosa estimulada por la insulina, pudiendo alcanzar más del 80% de la incorporación de la glucosa corporal (Dos Santos et al., 2015). Esto determina que al músculo estriado y sus alteraciones se le asigne un rol fundamental en la patogénesis de diversos trastornos metabólicos como la resistencia insulínica y la diabetes. La bibliografía se refiere a los efectos de la programación en la composición fibrilar del musculo vinculado a su relación con la resistencia insulínica, capacidad para captar glucosa y predisposición al síndrome metabólico. Algunos estudios referidos a este tema son los de Daugaard y Richter, (2001) y Gaster et al. (2001), quienes sugieren que el tipo de fibra afecta la sensibilidad insulínica generalmente a través de la expresión de GLUT4 que se encuentra en mayor proporción en fibras de tipo I y IIA en relación con los tipos más rápidos y glucolíticos. Esto da por sentado entonces que aquellas fibras de tipo II y cuyo metabolismo es predominantemente glicolítico son menos sensibles y más resistentes a la insulina (He et al., 2001; Nyholm et al., 1997). Sobra la base de estos conceptos es que en general se acepta que los eventuales cambios en la masa y en las poblaciones fibrilares que puedan ser provocados por efectos de programación fetal pueden repercutir en mayores predisposiciones a padecer trastornos metabólicos como resistencia insulínica o diabetes durante la vida adulta o la edad avanzada.

1.6. Tejido adiposo intramuscular, desarrollo, programación fetal e implicancias en el metabolismo animal

El tejido adiposo es un tipo de tejido conjuntivo que cumple diversas funciones en el organismo, como ser soporte de estructuras, fuente de energía, tener acción a nivel del metabolismo, además de cooperar en la regulación de procesos fisiológicos, entre otros (Frigolet & Gutiérrez, 2020). Existen diferentes depósitos de tejido adiposo en el organismo. Aquellos depósitos asociados al tejido muscular esquelético se denominan intermusculares e intramusculares, siendo los intermusculares los que se encuentran asociados a los espacios entre los músculos y el intramuscular el que incluye a todos los adipocitos que se encuentran entre las fibras musculares (Hausman et al., 2014). En cuanto a su dinámica de desarrollo, en la mayoría de las especies el tejido adiposo se hace evidente a mitad de la gestación. Su formación se da en parte, al mismo tiempo que la miogénesis y por ello se ha propuesto que, en situaciones de restricción nutricional, ésta última puede verse comprometida por la competencia generada en el desarrollo de ambos tejidos generándose desequilibrios en detrimento del tejido muscular viéndose afectado su desarrollo posterior (Du et al., 2015). De hecho, se ha demostrado que una subnutrición prenatal es capaz de afectar el desarrollo y las

características del tejido adiposo. Por ejemplo, Daniel et al. (2007) reportaron que corderos hijos de ovejas sometidas a una restricción nutricional no presentaron alteraciones en el contenido graso, aunque si se observaron algunas diferencias en los diámetros de los adipocitos perirrenales que fueron más grandes en aquellos corderos nacidos de madres restringidas durante los días 30-70 de gestación.

Por otra parte, además de que ambos procesos ontogénicos (mío y adipogénesis) se dan al mismo momento es importante considerar que mío y adipocitos tienen incluso un origen celular común (Figura 4); es decir que parten de una misma célula madre mesenquimal embrionaria y que se diferencien en uno u otro tipo celular dependerá de factores tales como la genética o la nutrición materna (Du et al., 2012).

Así como el músculo estriado cumple un rol metabólico crucial, lo mismo ocurre con el tejido adiposo y particularmente con el tejido adiposo asociado al músculo. Se ha estudiado que el tejido intermuscular en animales está asociado a la ingesta, a la respuesta inflamatoria e inmune, y a la resistencia a la insulina, entre otros, y que el tejido adiposo intramuscular se ha visto influenciado en animales por la edad, la dieta, el sexo y la genética, demostrándose además que las variaciones de ambos depósitos adiposos han afectado a nivel metabólico y fisiológico (Hausman, et al. 2014).

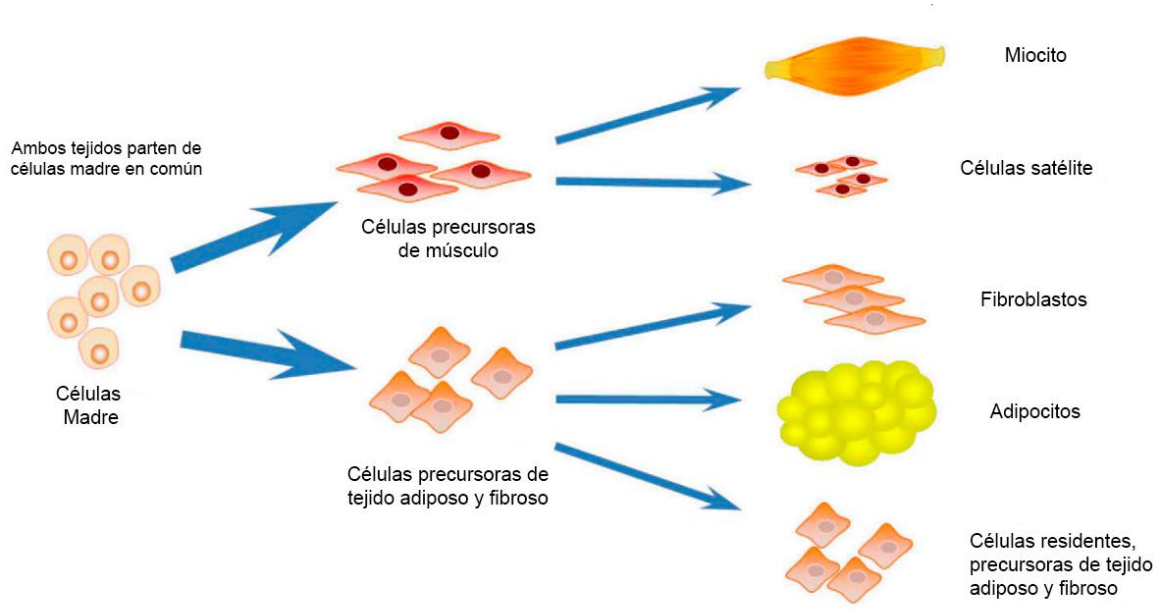


Figura 4. Esquema del desarrollo muscular fetal donde se muestra como las líneas celulares propias del tejido adiposo, tejido conjuntivo de sostén y tejidos muscular parten de una misma célula madre para posteriormente diferenciarse (Adaptado de Du et al., 2013)

Asimismo, el tejido adiposo asociado al músculo y sus cambios están muy relacionados con los efectos del envejecimiento sobre la salud de los individuos. El peso y el envejecimiento son dos factores importantes cuando se habla de tejido adiposo intramuscular. En el humano, existen diversos estudios que han determinado

que el musculo tiende a acumular tejido adiposo intramuscular a medida que una persona envejece o sufre de obesidad, y que, por lo tanto, músculos con mayor cantidad de adipocitos intramusculares hacen que haya una pérdida de fuerza y calidad del mismo (Rahemi et al., 2015). Se ha demostrado también que los adipocitos intramusculares aumentan con la edad y a su vez esto conlleva una pérdida de fuerza y de masa muscular (Akazawa et al., 2020).

Por otra parte, el contenido y las características morfológicas y funcionales del tejido adiposo intramuscular también están relacionadas a las capacidades metabólicas musculares y especialmente a la sensibilidad insulínica. Se ha demostrado que un aumento en la cantidad de tejido adiposo intramuscular (adipocitos distribuidos en el perimisio muscular) está vinculada a una menor sensibilidad a la insulina (Ingram et al., 2011). En síntesis, podemos concluir que el tejido adiposo asociado al músculo puede ser afectado en su desarrollo por causa de la programación fetal y que dichos efectos son importantes para la salud muscular y por ende para la salud del individuo, siendo estos efectos particularmente importantes en edades avanzadas de la vida.

No obstante, a pesar de la importancia de los adipocitos intramusculares para la función muscular y la salud metabólica de los individuos, la literatura respecto a efectos de programación fetal sobre el desarrollo de este tejido adiposo en particular es muy escasa. Varios autores han reportado efectos de programación fetal sobre el desarrollo de adipocitos de otros depósitos grasos como los subcutáneos o perirrenales (Long et al., 2012; Ramírez et al., 2020; Rehfeldt, et al 2012; Underwood et al., 2010; Zhang et al., 2022). Sin embargo, en la literatura consultada no se encontraron trabajos enfocados específicamente a estudiar los efectos de programación fetal sobre el desarrollo y la morfometría del tejido adiposo intramuscular. En ovinos, nuestro equipo de investigación (Ithurralde et al., 2021) recientemente reportó una tendencia a que los adipocitos intramusculares en el musculo *Semitendinosus* de corderos de 200 días que habían sufrido RCIU fueran de menor diámetro, al tiempo que observaron que aquellas hembras que habían padecido RCIU tuvieron más contenido de lípidos totales en el músculo *Supraspinatus* (Ithurralde et al., 2021), lo que sugiere posibles efectos de programación fetal por subnutrición sobre el desarrollo del tejido adiposo intramuscular.

1.7. Efecto diferencial de la programación fetal dependiendo del tipo de gestación (único o mellizo

Según Gootwine et al. (2007) la restricción en el crecimiento intrauterino (RCIU) puede ocurrir en los ovinos por múltiples causas inducidas o naturales, entre las que se destaca la gestación múltiple. Estos autores plantean que la causa del RCIU que padecen los mellizos probablemente sea una falla en la unidad útero placentaria para garantizar el debido aporte de nutrientes y oxígeno a los individuos que se están desarrollando dentro del mismo útero. Corderos de gestación múltiple tienen menor flujo sanguíneo uterino y además una placenta menos vascularizada por lo que el suministro de oxígeno es menor (Sales et al., 2018). Por otra parte, los efectos del RCIU generado por las gestaciones múltiples han recibido bastante atención por el impacto que pueden tener a largo plazo en la predisposición a padecer enfermedades

crónicas y/o metabólicas en mellizos humanos. En ese sentido, estudios llevados a cabo en Dinamarca por Poulsen et.al. (1999) y cuyo objeto de estudio fueron gemelos humanos, demostraron que la presentación o no de diabetes en hermanos gemelos se relacionaba al peso al nacimiento, de forma tal que el hermano nacido con pesos menores era el más predispuesto a padecer esta enfermedad. No obstante, a pesar de que varios antecedentes demuestran que la gestación múltiple puede inducir por sí misma efectos de programación fetal, la información relacionada a cómo pueden variar los efectos de programación fetal por causa de una subnutrición materna en función del tipo de gestación son más limitados. De acuerdo con lo revisado por Gootwine et al. (2007) las adaptaciones feto placentarias en respuesta a la subnutrición materna podrían ser distintas dependiendo del tipo de gestación y por lo consiguiente fetos simples o múltiples podrían verse afectados de forma diferente por la subnutrición materna. Según Vonnahme et al. (2003) la restricción del 50% de los nutrientes a ovejas gestantes entre los días 28 y 78 de gestación aumenta la vascularización de las carúnculas en las gestaciones múltiples, pero no en las simples. En el mismo sentido, Newnham et al. (1991) reportaron que la restricción nutricional materna en la mitad de la gestación reduce el flujo sanguíneo uterino en gestaciones simples, pero no en dobles, lo que podría indicar la posibilidad de algún tipo de compensación en las gestaciones múltiples. Por otra parte, en lo que respecta al desarrollo de las crías, Edwards y McMillen (2002a) luego de aplicada una restricción energética por un periodo comprendido entre el día 8 a 147 de gestación en un grupo de ovejas de parto simple y otro de parto doble, constataron un aumento en el peso de las glándulas adrenales en hijos de las ovejas restringidas de parto doble. En este mismo trabajo los autores demostraron además que existió una interacción entre la subnutrición materna y el tipo de gestación para la función del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal de forma tal que la subnutrición materna aumentó los niveles de ACTH sanguíneos en los fetos de gestación doble sin evidenciarse este efecto en los simples (Edwards & McMillen, 2002a). A su vez, el mismo equipo de investigadores y en un experimento de similares características donde se sometieron a las ovejas gestantes a una restricción alimenticia de 70%, demostraron que existía una interacción entre la subnutrición materna durante la peri concepción y la función del sistema cardiovascular antes del nacimiento que básicamente consistió en que la presión arterial estuvo aumentada por causa de la restricción nutricional en los individuos de gestación doble pero no en los simples (Edwards & Macmillen, 2002b).

No obstante, a pesar de estos antecedentes que demuestran que la subnutrición intrauterina podría repercutir de forma diferente en el desarrollo de individuos nacidos de parto simple o múltiple, en la bibliografía revisada no se encontraron trabajos que evaluaran los efectos de programación fetal por subnutrición y su interacción con el tipo de gestación sobre el peso de los principales órganos y la masa e histología muscular en ovejas de edad avanzada.

2. HIPÓTESIS

La subnutrición materna inducida por una menor oferta de forraje de campo natural desde 23 días antes de la concepción hasta el día 122 de gestación afecta (aumentando o disminuyendo) las dimensiones corporales, los pesos de los principales órganos y la masa e histología muscular en ovejas adultas de edad avanzada. Asimismo, los efectos de la subnutrición materna sobre el desarrollo dependen del tipo de gestación (doble o simple).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General:

Aportar conocimiento original acerca del impacto a largo plazo de la subnutrición gestacional y su interacción con el tipo de gestación (simple o doble), sobre el desarrollo de diferentes órganos, las dimensiones corporales y la masa e histología muscular en animales adultos de edad avanzada.

3.2. Objetivos específicos:

Evaluar el efecto de una menor oferta de forraje de campo natural desde 23 días antes de la concepción hasta el día 122 de gestación y su interacción con el tipo de gestación (doble o simple) sobre:

3.2.1. Dimensiones corporales: Longitud Cráneo caudal (LCC), Perímetro torácico (PT), Largo de pierna izquierda (LPI), Perímetro del muslo (PM), Altura a la cruz (AC), Ancho de grupa (AG) y Longitud de grupa (LG) de ovejas de edad avanzada (7 años).

3.2.2. Pesos de los músculos: *Semitendinosus* (ST), *Gluteobiceps* (GB), y *Supraspinatus* (SS) de ovejas de edad avanzada (7 años).

3.2.3. Pesos de Órganos: Hígado, Riñones, Glándulas adrenales, Corazón, Tracto reproductor, Encéfalo, Cerebro y Cerebelo de ovejas de edad avanzada (7 años).

3.2.4. Características histológicas musculares: Porcentaje de fibras PAS intensas, intermedias y leves; y densidad, diámetro y área promedio de adipocitos intramusculares en los músculos ST, GB y SS de ovejas de edad avanzada (7 años).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos llevados a cabo con los animales fueron debidamente aprobados (Protocolo CHEA 1320/21-CEUA-FVET Dist. 713/21).

4.1. Diseño experimental y animales

Para este experimentó se utilizaron 28 ovejas Corriedale (20 de parto simple y 8 de parto múltiple) nacidas en la primavera de 2013 cuyas madres(n=28) pastorearon desde 23 días antes de la concepción hasta el día 122 de gestación sobre campo natural, a dos ofertas de forraje diferentes: Grupo AOF (Alta oferta de forraje; n=15;11 simples y 4 dobles) pastorearon a 10-12 kg MS/100 kg de peso vivo (PV)/día, y Grupo BOF (Baja oferta de forraje; n=13;9 simples y 4 dobles) pastorearon a 5-8 kg MS/100 kg PV/día (Pérez-Clariget et al., 2023). El tratamiento nutricional de las ovejas gestantes se llevó a cabo en la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt, Facultad de Agronomía, Cerro Largo.

El diseño experimental utilizado fue de bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento. Se utilizaron 32 hectáreas de campo natural, divididas en 6 parcelas de tal manera que cada tratamiento estaba representado en tres parcelas. Se contaba con un total de 335 Ovejas Corriedale, multíparas con un peso vivo y condición corporal que se encuentra detallado en Abud et al. (2020). Durante la estación reproductiva (marzo) y 23 días antes de la inseminación artificial las ovejas fueron asignadas al azar, teniendo en cuenta su peso vivo y su condición corporal a dos planos nutricionales: Grupo Alta oferta de forraje y Grupo Baja oferta de forraje. El pastoreo fue continuo y los animales tenían libre acceso al agua. Desde el día 122 de gestación hasta 72 h después del parto todas las ovejas pastorearon como un solo grupo una pradera de *Festuca arundinacea (*oferta de forraje 14 kg MS/100 kg P V/día); todas las ovejas fueron suplementadas con 200 g/animal/día de afrechillo de arroz mezclado con 50 mL de glicerina desde una semana antes de la esquila (día 122 de gestación) hasta 72 h después del parto. Posteriormente, las ovejas pastorearon en el mismo potrero de campo natural a una oferta considerada no restrictiva. Los balances nutricionales de las ovejas gestantes durante el período experimental fueron previamente publicados por Abud et al. (2020). En resumen, los requerimientos de energía y proteína durante la gestación fueron cubiertos por completo en aquellos animales pertenecientes al grupo AOF, mientras que los del grupo BOF se vieron cubiertos parcialmente. Sólo durante el período comprendido entre los días -23 (23 días previo a la IA) y 24 los requerimientos energéticos se vieron cubiertos en su totalidad, mientras que durante el resto del tratamiento se cubrió entre un 74-84% de la energía requerida. Algo similar sucedió con los requerimientos de proteína. El grupo AOF cubrió sus requerimientos entre los días -23 y 58 de gestación y luego el tratamiento alcanzó un 69-83% del total requerido. Esto no fue así para el grupo BOF donde solo entre los días -23 y 24 de gestación se cubrió el 100% de los requerimientos proteicos. Luego, durante lo que duró el tratamiento se llegó a cubrir un 50-70% del total de la proteína requerida. Esto significa que tanto el balance energético como proteico difirió en un 21-28% entre los grupos y durante el tratamiento. Los pesos y condiciones corporales (CC) de las ovejas gestantes madres

de los animales incluidos en el presente experimento han sido publicados por Pérez-Clariget et al. (2023). En síntesis, la oferta de forraje de campo natural no afectó el peso corporal de las ovejas, mientras que hubo efecto significativo del tratamiento sobre la CC. Las ovejas pertenecientes al grupo de AOF tuvieron mejor CC que aquellas del grupo BOF (2,68 vs. 2,55 ± 0.04, respectivamente; P<0,01) (Pérez-Clariget et al., 2023). Tras el parto, las corderas fueron pesadas al nacer no existiendo diferencias significativas en el peso entre corderas de ambos tratamientos (3,9 ± 0,25 kg vs. 3,7 ± 0,25 kg, AOF y BOF, respectivamente). Las corderas mellizas fueron más livianas al nacer (4,3 ± 0,25 kg vs. 3,3 ± 0,25 kg, simples y dobles, respectivamente; P=0,01), no habiéndose detectado efectos de la interacción entre tratamiento y tipo de parto (Pérez-Clariget et al., 2023). Las corderas fueron criadas, destetadas y mantenidas en la majada en igualdad de condiciones nutricionales y de manejo general hasta los 7 años de vida (junio de 2021), momento en el que fueron trasladadas al Instituto de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria (Libertad, San José) donde fueron sacrificadas en la Unidad de Faena Móvil del INAC.

4.2. Medición de dimensiones corporales

El día antes de la faena (junio 2021) se procedió a tomar las dimensiones corporales de las ovejas que se iban a faenar al día siguiente. Se midieron: Longitud Cráneo caudal (LCC): desde articulación atlanto-occipital hasta articulación sacro-coccígea, Perímetro torácico (PT): máximo perímetro del tórax, Largo de pierna izquierda (LPI): desde tuberosidad isquiática a la articulación femorotibial, Perímetro del muslo izquierdo (PMI): máximo perímetro del miembro posterior izquierdo a la altura del muslo, Altura a la cruz (AC): Distancia desde el punto más alto de la región interescapular al suelo por la extremidad anterior izquierda, Ancho de grupa (AG): distancia desde el tuberosidad isquiática derecha a tuberosidad isquiática izquierda y Longitud de la grupa (LG): Distancia desde el punto de unión de la región del lomo con la grupa hasta el suelo.(Abud et al., 2020; Bravo & Sepúlveda, 2010; Ithurralde et al., 2019)

4.3. Registro de las ovejas a la faena

Todos los animales fueron faenados siguiendo la siguiente metodología: insensibilización utilizando pistola de perno cautivo, degüello y sangrado, desollado, separación de la cabeza y porciones distales de las extremidades, eviscerado, dressing y lavado. Luego de la evisceración se registraron los pesos de los siguientes órganos: hígado, ambos riñones, ambas glándulas adrenales, corazón y tracto reproductor. Finalmente, se procedió a la disección y registro del peso de los siguientes músculos de las medias canales izquierdas: *Semitendinosus* (ST), *Gluteobiceps* (GB), *Supraspinatus* (SS)

4.4. Disección y registro de peso del encéfalo

Para la disección y registro de los pesos de encéfalo, cerebro y cerebelo, al final de cada jornada de faena se trasladaban las cabezas de las ovejas faenadas al Departamento de Anatomía animal de Facultad de Veterinaria donde fueron congeladas en freezers a -20ºC. Posteriormente se procedió a una disección de los músculos craneales y una posterior horadación del cráneo utilizando una sierra. Se

retiro encéfalo y se pesaron los órganos en fresco. Finalmente, se colocaron en una dilución de Formol al 10% por una semana. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a la disección y el registro final de los pesos del encéfalo, cerebro y cerebelo.

4.5. Procesamiento y análisis histológicos en músculos esqueléticos

Inmediatamente después de la faena se tomó muestras superficiales de la porción media del vientre expuesto de los músculos ST, GB y SS las cuales se fijaron por congelación en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80º C. Las muestras fueron incluidas en gel para crióstato (Cryomatrix, Thermo Shandon Limited, USA) y secciones transversales de 24µm de espesor se obtuvieron en un crióstato. Los cortes se trataron con la reacción histoquímica de PAS (Schaart et al., 2004; Ithurralde et al., 2021) para realizar las evaluaciones histológicas de las fibras musculares y del tejido adiposo intramuscular según lo descrito en Ithurralde et al. (2021). Los análisis morfométricos fueron realizados mediante un software de análisis de imagen (Infinity analyze®, Toronto, Canadá). Los porcentajes de las fibras PAS positivas (intensas, medias y leves) fueron calculadas mediante el conteo de al menos 500 fibras en zonas aleatorias del preparado a través del uso de un microscopio óptico (Ithurralde et al., 2021).

Los mismos preparados histológicos teñidos con la reacción de PAS y el mismo software fueron utilizados para los análisis morfométricos de los adipocitos intramusculares. Se determinó la densidad de adipocitos en el perimisio intramuscular a través del conteo de los adipocitos presentes en un área de perimisio previamente medida con el software. Esta determinación se realizó en al menos 6 áreas de tabique de perimisio fotografiadas aleatoriamente por animal y por músculo. La densidad de adipocitos en cada área de perimisio fotografiada se calculó dividiendo el área de tabique medida entre la cantidad de células contadas y se dividió entre 0,0001 para expresarla como cantidad de adipocitos por μm^2 por 10 a la menos 4. Las mismas fotografías usadas para medir la densidad de adipocitos fueron utilizadas para determinar el área de sección transversal y el diámetro de los adipocitos. Estas variables fueron medidas utilizando el mismo software en al menos 80 adipocitos por animal y por músculo, y se expresaron como el promedio de todas las mediciones. (Ithurralde et al., 2021)

4.6. Análisis estadístico

La normalidad de los datos se analizó utilizando la prueba Saphiro Wilk. Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico SAS utilizando modelos mixtos (PROCMIXED) e incluyendo el tratamiento nutricional, el tipo de parto y su interacción como efectos fijos y el bloque como efecto aleatorio. La interacción entre el bloque y el tratamiento se incluyó en el modelo como factor aleatorio pero la misma fue removida del modelo cuando la estimación del parámetro de covarianza fue cero o cercano a cero. Además de los efectos ante dichos, para el caso de los análisis de variables musculares (peso y determinaciones histológicas) se incluyó al músculo como efecto fijo en los modelos. El efecto se consideró significativo cuando $P \leq 0,05$ y tendencia cuando $0,05 < P \leq 0,1$.

5. RESULTADOS

5.1. Efectos sobre las medidas morfométricas corporales

El tratamiento nutricional de las madres no afectó ninguna de las variables morfométricas corporales medidas en las ovejas (P ≥ 0,30).

El tipo de parto tendió a afectar la altura a la cruz y el ancho de la grupa (P = 0,07 y 0,09, respectivamente). Ambas variables fueron mayores en las ovejas nacidas de parto simple (Cuadro 1).

Por otra parte, se detectó un efecto significativo para la interacción entre el tratamiento y el tipo de parto (P=0,006) sobre la longitud cráneo caudal (CC). Las ovejas del grupo AOF con partos dobles tuvieron una longitud CC mayor que las simples del mismo grupo, mientras que las dobles del grupo BOF tuvieron una longitud CC menor que las simples del mismo grupo (Cuadro 2).

Cuadro 1. Valores promedio para las variables morfométricas en ovejas adultas nacidas de partos dobles o simples pertenecientes a ambos tratamientos (AOF y BOF) y valores promedio para las ovejas de los grupos AOF y BOF de ambos tipos de parto pooleados.

Variable	Simples	Dobles	AOF	BOF	P valor tp	P valor trat
Longitud CC (cm)	88,12±1,70	89,77±2,56	90,25±2,31	87,63±2,02	0,60	0,40
Altura Cruz (cm)	78,79±2,77	71,90±3,44	77,08±3,15	73,62±2,91	0,07	0,30
Longitud Grupa (cm)	29,40±0,48	28,33±0,73	28,40±0,66	29,33±0,57	0,24	0,30
Largo pierna (cm)	53,92±0,62	54,54±0,95	54,42±0,85	54,04±0,74	0,59	0,74
Perímetro torácico (cm)	102,90±1,26	100,17±1,91	101,95±1,73	101,11±1,50	0,25	0,72
Perímetro Muslo (cm)	30,77±0,75	29,38±1,13	29,61±1,02	30,54±0,89	0,32	0,50
Ancho Grupa (cm)	31,19±0,79	28,63±1,20	30,36±1,08	29,46±0,94	0,09	0,54

CC: cráneo-caudal, trat: tratamiento, tp: tipo de parto

Cuadro 2. Valores promedio para variables morfométricas medidas en ovejas adultas de partos simples y dobles de los tratamientos AOF y BOF.

Variable	AOF		BOF		P valor interacción trat*tp
	Simples	Dobles	Simples	Dobles	
Longitud CC (cm)	84,64 ± 2,53[b]	95,87 ± 3,85[a]	91,60 ± 2,23[a]	83,67 ± 3,34[b]	0,006
Altura Cruz (cm)	80,40 ± 3,44	73,75 ± 4,58	77,18 ± 3,12	70,05 ± 4,13	0,94
Longitud Grupa (cm)	29,14 ± 0,72	27,67 ± 1,10	29,67 ± 0,64	29,00 ± 0,96	0,65
Largo pierna (cm)	55,00 ± 0,94	53,83 ± 1,43	52,83 ± 0,83	55,25 ± 1,24	0,13
Perímetro torácico (cm)	105,07 ± 1,89	98,83 ± 2,89	100,72 ± 1,67	101,50 ± 2,50	0,14
Perímetro Muslo (cm)	30,71 ± 1,12	28,50 ± 1,71	30,83 ± 0,99	30,25 ± 1,48	0,56
Ancho Grupa (cm)	31,71 ± 1,18	29,00 ± 1,81	30,67 ± 1,04	28,25 ± 1,57	0,92

CC: cráneo-caudal, trat: tratamiento, tp: tipo de parto.

Dentro de una misma fila las medias acompañadas por literales diferentes fueron distintas (a vs. b; P ≤ 0,05).

5.2. Efecto sobre el peso de la carcasa y los órganos

Ni el tratamiento ni la interacción entre el tratamiento y el tipo de parto afectaron el peso de la carcasa (P = 0,61 y 0,86, respectivamente). No obstante, el peso de la carcasa de las ovejas con tipo de parto doble tendió (P = 0,08) a ser menor que el de las de las ovejas de parto simple (14,86 ± 1,26 kg vs. 17,62 ± 0,83 kg, para las carcasas de ovejas de parto doble y simple, respectivamente).

Con respecto al peso de los órganos, el tratamiento solamente afectó el peso promedio de los riñones (P = 0,02; Cuadro 3), con riñones más pesados en los animales BOF (Cuadro 4). El tipo de parto no afectó el peso de ninguno de los órganos evaluados (P ≥ 0,26; Cuadro 3). Sin embargo, se detectaron algunas interacciones entre el tratamiento y el tipo de parto para el peso de algunos órganos (Cuadro 3). Las ovejas de partos dobles del grupo AOF tuvieron corazones más livianos en comparación a las simples del mismo grupo (Cuadro 4). Otro órgano que presentó en este caso una tendencia a la interacción tratamiento por tipo de parto (P = 0,09) fue la adrenal; aquí las ovejas de parto doble del grupo BOF tendieron a tener adrenales más pesadas que el resto de los grupos, (Cuadro 4).

Cuadro 3: P valores para los efectos principales tratamiento, tipo de parto y su interacción para los pesos de carcasa y órganos.

Variable	Tratamiento	tipo de parto	Tratamiento*tipo de parto
Peso de la adrenal	0,44	0,81	0,09
Peso de la carcasa	0,61	0,08	0,86
Peso del cerebro	0,34	0,93	0,90
Peso del corazón	0,26	0,26	0,02
Peso del cerebelo	0,71	0,39	0,84
Peso del encéfalo	0,13	0,98	0,32
Peso del hígado	0,72	0,59	0,52
Peso de los ovarios	0,53	0,81	0,48
Peso del tracto reproductivo	0,92	0,86	0,82
Peso del riñón	0,02	0,56	0,43

Cuadro 4: Valores promedio de los pesos (medias ± errores estándar de la media) para carcasa y órganos de ovejas adultas para los tratamientos AOF y BOF, de tipo de parto Simple y Doble y de ambos tipos de partos pooleados.

	AOF			BOF		
	syd	Simples	Dobles	syd	Simples	Dobles
Carcasa (g)	15,85 ± 1,12	17,10 ± 1,17	14,60 ± 1,91	16,63 ± 1,01	18,15 ± 1,17	15,11 ± 1,65
Adrenales (g)	4,67 ± 0,23	4,91 ± 0,24^{y}	4,43 ± 0,40^{y}	4,91 ± 0,21	4,60 ± 0,23 ^{y}	5,23 ± 0,34^{x}
Cerebro (g)	74,21 ± 2,28	73,88 ± 2,38	74,53 ± 3,89	77,18 ± 2,02	77,23 ± 2,24	77,14 ± 3,37
Corazón (g)	224,76 ± 8,34	245,63 ± 8,71^{a}	203,90 ± 4,22^{b}	237,98 ± 7,54	230,14 ± 8,71^{a}	245,83 ± 12,31^{a}
Cerebelo (g)	10,76 ± 0,85	10,15 ± 0,88	11,37 ± 1,44	11,18 ± 0,75	10,80 ± 0,83	11,57 ± 1,25
Encéfalo (g)	144,39 ± 4,18	147,30 ± 4,36	141,48 ± 7,13	153,14 ± 3,71	150,35 ± 4,11	155,93 ± 6,17
Hígado (g)	463,80 ± 21,29	480,93 ± 22,24	446,67 ± 6,32	474,10 ± 18,90	472,48 ± 20,97	475,73 ± 31,45
Ovarios (g)	2,62 ± 0,23	2,55 ± 0,24	2,70 ± 0,40	2,83 ± 0,21	2,98 ± 0,23	2,67 ± 0,35
Tracto reproductor(g)	84,54 ± 3,49	84,41 ± 3,65	84,67 ± 5,95	84,07 ± 3,10	85,04 ± 3,44	83,10 ± 5,16
Riñones (g)	88,84 ± 5,72^{b}	89,55 ± 5,79	88,14 ± 8,65	104,45 ± 5,20 ^{a}	100,11 ± 5,66	108,80 ± 7,54

Syd: simples y dobles

Las medias acompañadas por literales diferentes dentro de una misma fila fueron (a vs b; $P < 0,05$) o tendieron a ser (x vs. y; $P \leq 0,10$) diferentes

5.3. Efectos sobre el peso muscular

El peso muscular no fue afectado por el tratamiento nutricional de las madres (P= 0,19), aunque el tipo de parto produjo un efecto significativo (P= 0,04) sobre el peso promedio muscular con músculos más livianos en los animales de partos dobles (181,94 ± 8,07 g y 201,82 ± 5,06 g para partos dobles y simples, respectivamente). El tipo de músculo indujo un efecto significativo (P < 0,0001) sobre el peso muscular, de forma tal que el GB fue más pesado que los músculos ST y SS. Por otra parte, no hubo efecto significativo para la interacción entre tratamiento y el músculo (P= 0,33) ni para la triple interacción entre tratamiento, músculo y tipo de parto (P = 0,49). No obstante, se detectó un efecto significativo para la interacción entre el tratamiento y el tipo de parto (P = 0,0188) que implicó que dentro de las ovejas AOF el tipo de parto doble produjo músculos más livianos, mientras que entre ovejas BOF no existió diferencias en el peso muscular de ovejas simples y dobles (Cuadro 5).

Cuadro 5. Pesos (medias ± errores estándar de la media) de los músculos GB, ST, SS y de los tres músculos pooleados en ovejas de los tratamientos AOF y BOF, de partos simples y dobles y de ambos tipos de parto pooleados.

	AOF			BOF		
	syd	Simples	Dobles	syd	Simples	Dobles
GB (g)	323,14 ± 8,74	354,75 ± 9,03	291,53 ± 14,97	347,91 ± 8,00	342,77 ± 9,98	353,05 ± 14,97
ST (g)	113,92 ± 8,74	130,04 ± 9,03	97,80 ± 14,97	116,97 ± 9,81	116,21 ± 9,98	117,73 ± 16,90
SS (g)	119,48 ± 8,74	136,30 ± 9,03	102,65 ± 14,97	129,87 ± 8,00	130,83 ± 9,98	128,90 ± 14,97
Promedio peso de los 3 músculos (g)	185,51 ± 6,57	207,03 ± 6,79[a]	163,99 ± 11,26[b]	198,25 ± 6,89	196,60 ± 7,50[a]	199,89 ± 11,56[a]

syd: simples y dobles

Las medias acompañadas por literales diferentes dentro de una misma fila fueron (a vs b; $P < 0,05$) o tendieron a ser (x vs. Y; $P \leq 0,10$) diferentes.

5.4. Efecto sobre la distribución de fibras musculares con diferentes niveles de PAS positividad

El tratamiento no afectó los porcentajes de las fibras con diferentes niveles de PAS positividad (P≥ 0,53). Tampoco se detectó efectos sobre estas variables por parte de los factores tipo de parto (P≥ 0,77) ni de las interacciones entre tratamiento y tipo de parto (P≥ 0,55), tratamiento y músculo (P≥ 0,13) o la triple interacción entre tratamiento, tipo de parto y músculo (P ≥ 0,25). Por otra parte, el músculo afectó significativamente los porcentajes de las fibras con diferentes niveles de PAS positividad (P≤ 0,0026). El músculo ST mostró mayor porcentaje de fibras PAS leves que los músculos SS y GB. El GB presentó menor porcentaje de fibras PAS medias que los músculos SS y ST, en tanto que para el caso de las fibras PAS intensas, el GB fue el músculo con mayores porcentajes seguido del SS y el ST, por último, presentándose diferencias significativas entre todos ellos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje de fibras PAS leves, intensas e intermedias (medias ± errores estándar de la media) en los músculos GB, ST y SS de ovejas de los tratamientos AOF y BOF y de ambos tratamientos pooleados.

Variable	Mus	AOF	BOF	Media general	P valor trat.	P valor mus.
% PAS LEV	GB	18,32 ± 1,70	22,84 ± 1,74	20,58 ± 1,22^{b}	0,53	<,0001
	ST	27,63 ± 1,84	27,35 ± 1,76	27,49 ± 1,27^{a}		
	SS	20,66 ± 1,69	20,01 ± 1,89	20,34 ± 1,27^{b}		
% PAS MED	GB	29,66 ± 1,51	28,44 ± 1,54	29,05 ± 1,08^{b}	0,37	0,0026
	ST	33,86 ± 1,66	32,00 ± 1,57	32,93 ± 1,14^{a}		
	SS	34,89 ± 1,49	34,45 ± 1,70	34,67 ± 1,13^{a}		
% PAS INT	GB	52,04 ± 2,53	48,71 ± 2,57	50,38 ± 1,80^{a}	0,96	<,0001
	ST	38,51 ± 2,75	40,59 ± 2,62	39,55 ± 1,90^{c}		
	SS	44,44 ± 2,50	45,32 ± 2,82	44,88 ± 1,88^{b}		

LEV: leve, MED: media, INT: intensa, GB: *Gluteobiceps* ST: *Semitendinosus* SS: *Supraspinatus*, Mus.: Músculo, trat: tratamiento

Los músculos acompañados por literales diferentes dentro de cada variable para los valores promedio generales fueron diferentes (P < 0,05).

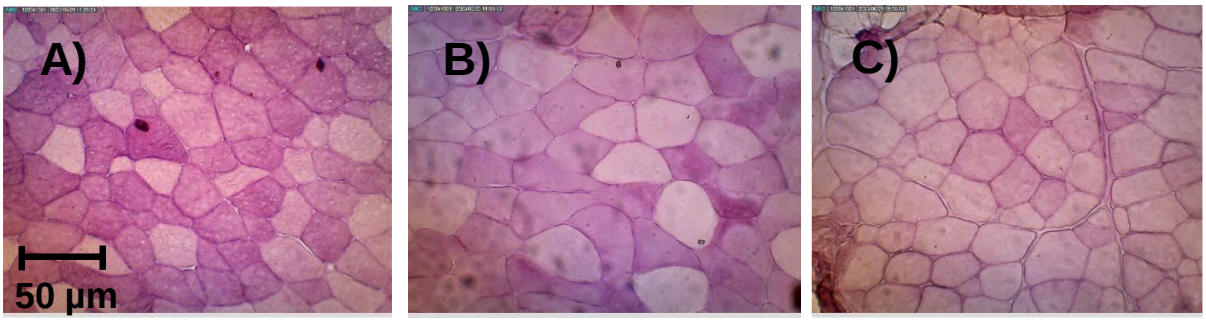


Figura 5 Micrografías de cortes transversales de los músculos Gluteobiceps (A), Supraspinatus (B) y Semitendinosus (C) tratados con la técnica PAS.

5.5. Efecto sobre la densidad y morfometría de los adipocitos del perimisio intramuscular

El tratamiento no afectó ninguna de las variables medidas en los adipocitos intramusculares ($P \geq 0,18$). Estas variables tampoco se vieron afectadas por el tipo de parto ($P \geq 0,54$) ni por la interacción entre el tratamiento y el tipo de parto ($P \geq 0,35$). No obstante, el músculo afectó significativamente todas las variables ($P < 0,0001$). La densidad adipocitaria en el músculo GB y ST fue mayor que en el músculo SS (Cuadro 7). El diámetro de los adipocitos ($P<0,0001$) fue significativamente mayor en el músculo SS con respecto al GB y ST (Cuadro 7). El músculo SS presentó un área de sección transversal adipocitaria mayor en comparación a los otros dos músculos ($P <0,0001$), mientras que el GB tendió a presentar un área de menor tamaño que el ST ($P= 0,095$) (Cuadro 7).

Por otra parte, se detectó una tendencia ($P = 0,0518$) a que la densidad adipocitaria fuera afectada por la interacción entre el tratamiento y el tipo de músculo de forma tal que se observó que el tratamiento de subnutrición aumentó la densidad adipocitaria solo en el músculo ST ($P = 0,014$) mientras que en los otros músculos no hubo diferencias en la densidad adipocitaria entre animales BOF y AOF ($P \geq 0,59$) (Cuadro 8). El diámetro adipocitario fue afectado por la interacción entre tratamiento y músculo ($P = 0,0467$) de forma tal que el tratamiento nutricional de las madres redujo el diámetro adipocitario solo en el músculo ST ($P = 0,008$) mientras que en los demás músculos no hubo efecto del tratamiento para esta misma variable ($P \geq 0,86$) (Cuadro 7). A su vez, también hubo una tendencia ($P = 0,0630$) a que las áreas de sección transversal adipocitarias estuvieran afectadas por la interacción entre el tratamiento y el músculo, de forma tal que el tratamiento nutricional redujo el área de sección transversal adipocitaria en músculo ST ($P = 0,010$), en tanto que no produjo ningún efecto en los músculos SS ni GB ($P \geq 0,91$) (Cuadro 7).

Por otra parte, el diámetro de los adipocitos tendió a estar afectado por la triple interacción entre tratamiento, músculo y tipo de parto ($P= 0,066$). Dentro de los animales de AOF el parto doble no afectó el diámetro adipocitario en los músculos GB y SS ($P\geq 0,22$), mientras que en el ST lo aumentó significativamente ($P = 0,02$). Por otra parte, dentro de los animales BOF el parto doble no produjo efecto sobre el diámetro adipocitario en ninguno de los músculos evaluados ($P \geq 0,32$) (Cuadro 8).

Cuadro 7. Diámetro de adipocitos, densidad adipocitaria y área de sección transversal adipocitaria (medias ± errores estándar de la media) en los músculos GB, ST y SS de ovejas de los grupos AOF y BOF y de ambos grupos pooleados.

Variable	Mus	AOF	BOF	Media general	P valor trat	P valor mus	P valor trat*musc
Diámetro adipocitos (µm)	GB	23,97 ± 2,09	24,41 ± 2,12	24,19 ± 1,49^{b}	0,18	<,0001	0,047
	ST	33,18 ± 2,30^{a}	24,37 ± 2,16^{b}	28,78 ± 1,58^{b}			
	SS	50,15 ± 2,06	50,68 ± 2,12	50,42 ± 1,48^{a}			
Densidad Adipocitos (nº/µm^{2} x 10^{-4})	GB	17,61 ± 1,18	16,69 ± 1,20	17,15 ± 0,84^{a}	0,29	<,0001	0,05
	ST	13,91 ± 1,30^{b}	18,48 ± 1,23^{a}	16,19 ± 0,89^{a}			
	SS	3,93±1,18	3,78 ± 1,20	3,86 ± 0,84^{b}			
Área Adipocitos (µm^{2})	GB	694,84 ± 200,83	727,28 ± 204,06	711,06 ± 143,15^{c}	0,18	<,0001	0,06
	ST	1451,81 ± 220,69^{a}	642,81 ± 207,86^{b}	1047,31 ± 151,58^{b}			
	SS	3136,79 ± 198,27	3160,76 ± 204,06	3148,77 ± 142,26^{a}			

mus: músculo, trat: tratamiento

Dentro de la columna de medias generales las medias acompañadas por literales diferentes indican diferencias significativas entre músculos para cada variable (a vs, b; P < 0,05).

Dentro de las filas, los valores para cada grupo (AOF y BOF) acompañados por literales diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, dentro de un mismo músculo en cada variable (a vs b; P < 0.05)

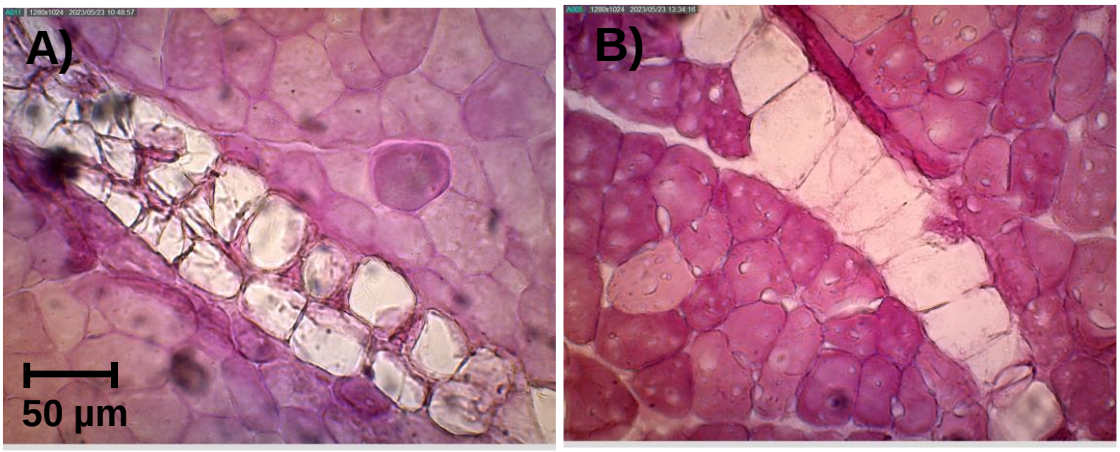


Figura 6 Micrografías de cortes transversales del músculo Semitendinosus (ST), de ovejas de los grupos BOF (A) y AOF (B) tratadas con la reacción histoquímica de PAS. Nótense las diferencias en la densidad adipocitaria y diámetro de los adipocitos si comparamos ovejas de baja oferta (foto izquierda) con las de alta oferta (foto derecha).

Cuadro 8. Diámetro adipocitario (µm; medias ± errores estándar de la media) para los músculos GB, SS y ST según el tratamiento (AOF/BOF) y el tipo de parto (simple o doble).

	AOF		BOF	
Músculo	Simples	Dobles	Simples	Dobles
GB	25,97 ± 2,23^{c}	21,96 ± 3,53^{c}	24,63 ± 2,36^{c}	24,20 ± 3,53^{c}
SS	52,69 ± 2,13^{a}	47,61 ± 3,53^{a}	52,71 ± 2,36^{a}	48,65 ± 3,53^{a}
ST	27,65 ± 2,13^{c}	38,72 ± 4,07^{b}	26,54 ± 2,50^{c}	22,19 ± 3,53^{c}

Las medias acompañadas por literales diferentes fueron distintas (P < 0,05).

6. DISCUSIÓN

6.1. Peso de los órganos:

Los resultados del presente trabajo indican que la subnutrición inducida por una menor oferta de forraje de campo natural desde el día 23 antes de la concepción hasta el día 122 de gestación no afecta el peso de los principales órganos de la progenie femenina cuando se las evalúa a edad avanzada (ovejas de 7 años de edad). No obstante, en las condiciones del presente estudio se demostró que el peso de los riñones fue significativamente afectado por el tratamiento nutricional de las madres, resultando que a los 7 años de edad los riñones fueron más pesados en aquellas ovejas nacidas de madres subnutridas durante la gestación. El hecho de que en el presente estudio no se encontraran diferencias debidas al tratamiento en el peso de los principales órganos de alguna manera se opone a lo que plantean diversos trabajos sobre programación fetal y subnutrición, que en general indican que situaciones de subnutrición durante períodos prolongados de la gestación son capaces de afectar el peso de los órganos, particularmente el de aquellos órganos más periféricos o menos centrales (Abud et al., 2020; Nathanielsz & Hanson, 2003). Como se comentó antes, estos efectos diferenciales sobre el peso de los órganos en general se explican sobre la base de mecanismos de priorización en la partición de nutrientes que implican estrategias de redistribución del flujo sanguíneo (Nathanielsz & Hanson, 2003). No obstante, la mayoría de los trabajos que han demostrado estos efectos han evaluado los pesos de diferentes órganos en etapas tempranas del desarrollo, y hasta donde sabemos, no existen antecedentes que lo hubieran hecho en ovejas de edad avanzada. Una posible explicación para el hecho de no haber encontrado efectos del tratamiento sobre los pesos de ciertos órganos como el hígado que generalmente resulta afectado por programación fetal, podría radicar en que en el presente estudio la progenie evaluada fue de sexo femenino. Efectivamente, nuestro propio equipo de investigación ha reportado que algunos efectos de programación fetal sobre el desarrollo corporal y el peso de ciertos órganos podrían ser más marcados en la progenie masculina que femenina (Ithurralde et al., 2019). Concretamente se demostró que una subnutrición inducida por una menor oferta de forraje de campo natural entre el día 30 y 143 de la gestación redujo el peso del corazón en los corderos machos, pero no en las corderas hembras cuando se los evaluó a los 200 días de vida (Ithurralde et al., 2019). Con relación a los efectos detectados sobre el peso de los riñones, nuestros resultados indican que de alguna manera el peso renal en las ovejas de edad avanzada podría haber estado condicionado por la subnutrición padecida durante el desarrollo intrauterino. Esta idea es en general consistente con diversos trabajos que han propuesto que la estructura y la función renal puede verse comprometida en la vida adulta por efectos de programación fetal durante el desarrollo prenatal. Diversos estudios (Moore et al., 1996; Plagemann et al., 2000; Woods et al., 2001; Xie et al., 2012) han demostrado que un ambiente desfavorable durante la etapa fetal puede repercutir negativamente en el desarrollo de los riñones y puede tener como consecuencia un aumento de presión arterial durante la vida adulta tanto en

humanos como en animales. Algunos autores también se refieren al impacto que tiene una subnutrición materna durante la preñez en relación a la nefrogénesis y la disminución en el número total de nefronas que conforman el riñón del animal adulto. Tal es así que Woods et al., (2001) afirman que, en ratas, una restricción proteica durante la gestación tardía suprimiría el sistema renina angiotensina intrarenal del recién nacido, resultando esto en una reducción en el número e hipertrofia de los glomérulos, e hipertensión en los animales adultos. Por otra parte, Alwasel (2017) demostró que en fetos de ratas al día 20 de gestación los riñones son más pequeños en animales gestados por madres restringidas nutricionalmente y a su vez, en estos animales, sus riñones son menos pesados en relación al peso corporal.

En cuanto a los resultados específicos, nuestro hallazgo de riñones más pesados en ovejas hijas de madres subnutridas de algún modo discrepan con lo descrito por Abud et al. (2020) quienes evaluaron el efecto de una menor oferta de forraje gestacional sobre el peso de órganos en corderos neonatos y demostraron que el tratamiento de subnutrición efectuado redujo el peso de los riñones. Asimismo, otros trabajos en ovinos han indicado que el peso de los riñones no es afectado por la subnutrición gestacional tanto cuando se lo evalúa en fetos (Abud et al., 2020; Pillai et al., 2017) como en animales entorno a la pubertad (Ithurralde et al., 2019). No obstante, Whorwood et al. (2001) obtuvieron hallazgos compatibles con los nuestros, demostrando que una subnutrición materna en ovejas durante los días 28 a 77 de gestación provoca que los riñones de los corderos neonatos fueran más pesados. Además, estos autores aportan que los riñones evaluados en los neonatos hijos de ovejas restringidas no solo eran más pesados, sino que poseían las dimensiones alteradas siendo más anchos y cortos. Esto último concuerda además con estudios previos en roedores que indican que la progenie de ratas subnutridas presentó riñones con similares alteraciones en las características morfológicas y que además se relacionó a la aparición de una patología asociada como la hipertensión (Nwagwu et al., 2000).

Por otra parte, los resultados del presente trabajo sugieren que algunos efectos de programación fetal sobre el peso de órganos en ovejas adultas podrían depender del tipo de gestación o parto. Es decir que podrían ser más o menos severos dependiendo de si esa oveja hubiera sido gestada como única o melliza. Otra manera de leer estos efectos de interacción entre subnutrición y tipo de gestación o parto puede ser en el sentido de que los efectos de programación que se producen por la gestación doble o mellicera son diferentes dependiendo del estatus nutricional de las madres gestantes. Por ejemplo, visto de ese modo, nuestros resultados indicarían que ovejas nacidas de partos dobles y simples presentan diferencias en el peso del corazón y de las adrenales solo cuando las madres las gestan en condiciones nutricionales más favorables, mientras que cuando las madres gestantes son subnutridas, el tipo de parto no produce diferencias en los pesos de estos órganos. Como se comentó en el capítulo de revisión bibliográfica, el tipo de gestación o la gestación múltiple produce efectos de programación fetal por sí misma dado que a pesar de la existencia de mecanismos placentarios compensatorios los fetos establecen competencia por nutrientes que afecta su desarrollo, siendo los fetos ovinos de gestación doble los mas afectados ne comparación con los gestaods simples (Greenwood et al., 2000; Gootwine et al., 2007). En ese sentido, el hecho de que dentro de las ovejas hijas de

madres de AOF, las nacidas de parto doble presentaran corazones más livianos podría considerarse consistente con diversos reportes que indican que el desarrollo del corazón es susceptible a efectos de programación fetal. Barker et al. (1986 y 1997) fueron los primeros en teorizar que el bajo peso al nacer estaba asociado directamente con alteraciones cardiovasculares en el adulto En concreto, y en cuanto a los efectos de la subnutrición sobre el peso del corazón, se han reportado diferentes efectos dependientes de ciertos factores como la especie, tipo de restricción y la edad en la cual se evaluaron dichos efectos. Abud et al. (2020) reportaron pesos del corazón disminuidos en fetos, pero no en neonatos, e Ithurralde et al. (2019) demostraron que los pesos de los corazones de corderos de 200 días de vida nacidos de madres subnutridas eran menores en los machos, pero no así en las hembras. No obstante, en lo que respecta a los efectos diferenciales de programación fetal dependiendo del tipo de gestación (simple o doble) la información disponible en la bibliografía es muy escasa. Particularmente en ovinos se encontró un antecedente que de algún modo es consistente con nuestros presentes hallazgos, en el cual se demostró que los efectos de programación fetal sobre la función cardiovascular podrían variar dependiendo del tipo de gestación. Es así que McMillen et al. (2001) estudiaron el impacto que tenía una restricción alimenticia durante la gestación tardía sobre la presión arterial fetal, la frecuencia cardiaca y la respuesta de la presión arterial fetal a la angiotensina II, y reportaron que como consecuencia de esta restricción efectuada hubo un aumento de la presión arterial fetal en mellizos, pero no en fetos simples. Este estudio permite demostrar además como el impacto de la restricción alimenticia sobre el ambiente intrauterino difiere según si es una gestación simple o doble y que esto podría llevar a un desarrollo alterado de diferentes sistemas y órganos fetales según el tipo de gestación.

Otra posible interpretación de los hallazgos relacionados al peso cardíaco podría implicar que los corazones de las ovejas mellizas cuyas madres fueron subnutridas podrían estar evidenciando, en edad avanzada, un estado patológico de hipertrofia cardíaca que determine que no existan diferencias en el peso cardíaco entre ovejas simples y mellizas dentro del grupo BOF. Esta teoría es de algún modo consistente con lo que plantean Porrello et al. (2008) en su revisión, donde los autores proponen que la cardiomiopatía hipertrófica podría deberse a efectos de programación fetal por subnutrición. De ese modo, podríamos especular con que la subnutrición durante la vida fetal podría haber inducido la hipertrofia cardíaca en ovejas BOF de parto doble repercutiendo en que no existieran diferencias en el peso cardíaco entre estas y su contraparte de ovejas BOF de parto simple.

Otro de los hallazgos encontrados en nuestro trabajo tiene relación con el peso de las glándulas adrenales. Aquí las ovejas dobles del grupo restringido nutricionalmente (BOF) tuvieron las adrenales más pesadas. Este hallazgo coincide con lo reportado por Phillips et al. (1996) quienes a través de un trabajo experimental en ovejas a las cuales les removieron las carúnculas uterinas antes de la concepción con el objetivo de generar una restricción nutricional in útero demostraron que las glándulas adrenales de fetos restringidos fueron más pesadas. Estos autores plantearon la posibilidad de que el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en aquellos fetos de madres restringidas cambien sus parámetros resultando en un mantenimiento de las concentraciones de ACTH (hormona adenocorticotrópica), aumento de la sensibilidad

de las adrenales a la ACTH y aumento del peso de las glándulas adrenales y a su vez de la producción de corticosteroides.

No obstante, en lo que respecta a los efectos diferenciales de programación fetal dependiendo del tipo de gestación (simple o doble) sobre el desarrollo adrenal, la información disponible en la bibliografía es muy escasa. Particularmente en ovinos se encontró un antecedente en el cual se demostró que los efectos de programación fetal sobre la función del eje hipotálamo hipófisis adrenal podrían variar dependiendo del tipo de gestación (Edwards et al., 2002a). En este trabajo, Edwards et al. (2002a) reportan que, si bien no existieron diferencias en el peso de las glándulas adrenales entre los fetos de parto simple de madres restringidas nutricionalmente o no, si existió un aumento significativo del peso de las glándulas adrenales en los fetos nacidos mellizos del grupo restringido, lo cual es consistente con nuestro hallazgo de adrenales más pesadas en las ovejas BOF de parto doble.

Como se comentó antes, estos autores investigaron el efecto del tipo de gestación, el sexo del feto y la nutrición materna sobre la funcionalidad del eje hipotálamo, hipófisis, adrenal en ovinos y encontraron interacción entre tratamiento y tipo de parto para algunas variables fisiológicas más allá del efecto sobre el peso de las adrenales. De hecho, ellos concluyen que hubo un efecto diferencial de la nutrición durante la peri concepción sobre el desarrollo y la función del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) entre simples y dobles.

En síntesis, los resultados de la presente tesis sugieren que una subnutrición inducida por una menor oferta de forraje de campo natural desde antes de la concepción hasta aproximadamente un mes antes del parto, no altera el peso de los principales órganos al evaluarlo en ovejas de edad avanzada, con la excepción de los riñones que se muestran más pesados en individuos que padecieron subnutrición fetal. Por otra parte, los resultados de esta tesis sugieren que algunos efectos de programación fetal a largo plazo inducidos por subnutrición fetal sobre el peso de los principales órganos podrían diferir según el tipo de parto o gestación.

6.2. Peso de los músculos:

Los resultados del presente trabajo indican que el tratamiento nutricional aplicado a las ovejas gestantes no afectó el peso de los músculos evaluados en sus hijas a los 7 años de vida. No obstante, de forma similar a como ocurrió con el peso de algunos órganos, nuestros resultados sugieren que el peso muscular podría estar afectado de forma diferencial por la subnutrición materna, dependiendo del tipo de gestación o parto. Resumidamente, nuestros resultados indicaron que dentro de las ovejas AOF el tipo de parto doble produjo músculos más livianos, mientras que entre ovejas BOF no existió diferencias en el peso muscular entre ovejas gestadas como simples y dobles. El hecho de que la menor oferta de forraje gestacional no repercutiera en el peso muscular de las crías en edad avanzada puede considerarse de algún modo inconsistente con la idea ampliamente aceptada de que el desarrollo muscular puede ser altamente susceptible a efectos de programación fetal por subnutrición, particularmente durante los primeros dos tercios de gestación (Fahey et al., 2005b; Kenyon y Blair, 2014). No obstante, como ya se comentó anteriormente, los trabajos que hayan demostrado estos efectos a largo plazo sobre la masa muscular son muy

escasos. En particular en la especie ovina, algunos trabajos han demostrado que la masa muscular puede verse disminuida por la subnutrición materna (Ithurralde et al., 2019; ithurralde et al., 2020; ithurralde et al., 2023). Sin embargo, fundamentalmente en estudios epidemiológicos humanos se ha demostrado que los efectos de programación fetal sobre la masa muscular y la composición corporal, particularmente a edades avanzadas podrían ser diferentes dependiendo del sexo del individuo (Kulkarni et al., 2014). Por ejemplo, un estudio realizado en Pelotas, Brasil por parte de Wells et al. (2012) relaciona de forma positiva a la rápida ganancia de peso durante diferentes periodos tempranos de crecimiento (peso al nacer y ganancia de peso hasta los 48 meses) con el tamaño y la composición corporal en la adolescencia y demuestra que este efecto positivo (más masa muscular y menos adiposidad corporal) sería más marcado en hombres que en mujeres. De manera similar en otro estudio epidemiológico en Filipinas, se demostró que los hombres que tuvieron un crecimiento rápido durante los primeros 6 meses de vida presentaron mayor masa muscular y fuerza, siendo estos efectos no observados en la progenie femenina (Kuzawa et al., 2010). Una de las razones a las cuales estos autores le atribuyen dichos efectos es a la adaptabilidad del eje hipotálamo-pituitario-gonadal encargado de la asignación de recursos para estimular tanto el crecimiento como el mantenimiento de características tales como la masa muscular (Bribiescas et al., 2001).

De hecho, esta idea general que plantea que los efectos de programación fetal por subnutrición sobre la masa muscular son más severos en la progenie masculina que la femenina fue recientemente confirmada por nuestro equipo de investigación en un experimento trabajando con ovinos e induciendo subnutrición gestacional en pastoreo de campo natural. En dicho trabajo se demostró que la subnutrición gestacional reduce la masa muscular en la descendencia masculina pero no en la femenina cuando se los evalúa a los 200 días de vida (Ithurralde et al., 2019). Estas diferencias dependientes del sexo podrían entonces contribuir a explicar el no hallazgo de efectos de tratamiento sobre el peso muscular en el presente estudio ya que los animales evaluados fueron de sexo femenino.

Por otra parte, en cuanto a los efectos diferenciales de la subnutrición sobre el peso muscular dependientes del tipo de gestación o parto, si bien los antecedentes en la bibliografía son muy escasos, existen algunos trabajos previos que de alguna manera acompañan a nuestros hallazgos sugiriendo que la subnutrición materna tiene un impacto diferente sobre el desarrollo muscular de mellizos o únicos (Edwards et al., 2004; Lie et al., 2014). Con el objetivo de determinar si la restricción de nutrientes maternos durante el período periconcepcional y gestacional daría lugar a la programación de una mayor adiposidad y a un aumento de la masa grasa fetal, Edwards et al. (2004) sometieron a ovejas Border Leicester x Merino a dos tratamientos nutricionales contrastantes (100 vs. 70% de los requerimientos totales) desde la peri concepción hasta el parto. Estos autores demostraron que los efectos de programación fetal por subnutrición sobre a la adiposidad de los fetos a término son diferentes según se trate de gestaciones simples o dobles. Concretamente reportaron que la disminución en la nutrición materna da como resultado un aumento en la adiposidad fetal en los fetos dobles, pero no en los fetos únicos (Edwards et al., 2004).

Mas recientemente, con el objetivo de estudiar el efecto de la subnutrición materna en el período periconcepcional y preimplantación sobre la señalización de insulina en músculos de fetos de ovejas simples y gemelares en la última etapa de la gestación, Lie et al. (2014) condujeron un experimento asignando ovejas a diferentes dietas experimentales. Estos autores demostraron que los efectos de la subnutrición sobre la expresión de moléculas relacionadas al control de la señal insulínica muscular son diferentes en fetos simples y en fetos mellizos. Concretamente, demostraron que, en fetos gemelares o mellizos, hubo un aumento por ejemplo en la abundancia del receptor de insulina tipo 1 a nivel muscular que no se evidenció en fetos de gestación simple. Según estos autores, una posibilidad para explicar estas diferencias pasaría por el hecho de que el entorno hormonal temprano de la gestación gemelar resulte en la programación de una mayor sensibilidad a la insulina, en lugar de una menor, en el músculo fetal en respuesta a la desnutrición materna. Los autores plantean a su vez que la programación de una mayor sensibilidad a la insulina actuaría para mantener el crecimiento muscular en el contexto de un entorno fetal previsto en el que el suministro de sustrato es limitado, como ocurre en una gestación doble o gemelar (Lie et al., 2014).

Otros trabajos también han sugerido que los efectos de programación fetal por subnutrición sobre algunos aspectos que podrían estar relacionados a la fisiología muscular serían distintos entre animales gestados como simples o mellizos. Todd et al. (2009) determinaron el efecto de la desnutrición periconcepcional materna en ovejas sobre la tolerancia a la glucosa en las crías antes y después de la pubertad y reportaron que el efecto de la subnutrición prenatal fue mayor en simples que en mellizos. De acuerdo con estos autores, sus hallazgos sugieren que la subnutrición prenatal de algún modo elimina las diferencias en la respuesta insulínica que típicamente existen entre individuos simples y mellizos (Rumball et al., 2008). Esta idea que en principio parece contradictoria, y que plantea que algunos efectos de programación fetal por subnutrición pueden ser menos severos en mellizos que en simples, ha sido expuesta por otros autores que proponen que la subnutrición afecta más severamente a aquellos fetos que experimentan un crecimiento o desarrollo prenatal más rápido (Barker, 1998; Harding, 1997). Efectivamente, Todd et al. (2009) proponen como posible explicación para sus hallazgos que los fetos mellizos al estar creciendo a tasas más lentas habrían sido menos afectados por la programación fetal y por ello muestran menos efectos negativos sobre el metabolismo de la glucosa durante su vida posnatal.

Por ende, sobre la base de la información antes resumida, podríamos hipotetizar con que, en el presente estudio, los efectos de programación fetal sobre el desarrollo muscular fueron menos severos en gestaciones dobles que en simples, lo que contribuiría a explicar porque no existieron diferencias en los pesos musculares entre animales dobles y simples dentro del grupo BOF.

En síntesis, los resultados de la presente tesis sugieren que una subnutrición inducida por una menor oferta de forraje de campo natural desde antes de la concepción hasta aproximadamente un mes antes del parto, no altera el peso muscular al evaluarlo en ovejas de edad avanzada. No obstante, los resultados de esta tesis sugieren que los

efectos de programación fetal por subnutrición a largo plazo sobre el peso muscular podrían diferir según el tipo de parto o gestación.

6.3. Histología muscular:

En relación a la histología muscular, nuestros resultados no sugieren cambios inducidos por el tratamiento sobre el perfil metabólico fibrilar dado que no se detectó efectos sobre la PAS positividad fibrilar. Estos hallazgos de alguna manera se oponen a diversos trabajos reportados en la bibliografía que indican que la subnutrición gestacional es capaz de inducir cambios en las poblaciones fibrilares musculares (Ithurralde et al., 2021; Ithurralde et al., 2023; Picard et al., 2002). No obstante, nuestros resultados deberían tomarse con precaución ya que si bien la técnica de PAS puede permitir una aproximación hacia el perfil metabólico fibrilar (Swatland, 1976) no se trata de una metodología específica, y por ende se requeriría el uso de técnicas histoquímicas, inmunohistoquímicas o moleculares para estudiar estos aspectos con la debida profundidad. De todos modos, la aplicación de la tinción de PAS en cortes histológicos musculares en el presente trabajo puede considerarse acertada ya que la misma permitió identificar diferencias entre músculos que son consistentes con diferencias metabólicas y contráctiles fibrilares reportadas previamente entre diversos músculos ovinos usando diferentes técnicas histoquímicas específicas combinadas (Ithurralde et al., 2015). Por otra parte, en el presente estudio se detectaron algunos efectos que indican que la subnutrición gestacional podría haber incidido en la morfometría y abundancia de los adipocitos intramusculares. Específicamente se halló que hubo interacción entre el tratamiento y el tipo músculo y entre tratamiento y tipo de parto para algunas variables relacionadas con la grasa intramuscular. Concretamente, los adipocitos en el ST de las ovejas BOF fueron más cantidad, pero con menor diámetro y área de sección transversal. Este hallazgo puede estar sugiriendo que la subnutrición gestacional produjo un aumento en la hiperplasia adipocitaria en ese músculo. Estos hallazgos son de algún modo consistentes con la teoría que sugiere que ante una restricción nutricional prenatal los procesos de desarrollo de los tejidos muscular y adiposo pueden competir de forma tal que un proceso puede verse beneficiado por sobre el otro (Du et al., 2015). De hecho, la presencia de un mayor número de adipocitos intramusculares en las ovejas hijas de madres subnutridas es consistente de algún modo con la idea general que vincula programación fetal por subnutrición y una mayor masa adiposa corporal.

La programación fetal, inicialmente relacionada con desnutrición fetal, se asoció con un mayor riesgo de obesidad central y diabetes en la vida adulta (Barker, 1998). El crecimiento fetal está influenciado por el entorno intrauterino y existen problemas en ambos extremos del espectro del peso al nacer, con una relación curvilínea entre el peso al nacer y el riesgo futuro de obesidad (Parsons et al., 2001). Se propone que el feto “censa” su estado nutricional futuro a través de señales intrauterinas de la madre y responde de maneras que establecen influencias duraderas en el control del peso y el apetito (Gluckman et al., 2007). De hecho, se ha demostrado que muchos metabolitos y hormonas de la sangre del cordón umbilical están asociados con el peso

al nacer y la adiposidad en los bebés humanos (Friedman, 2018). Paradójicamente, tanto un entorno intrauterino nutricionalmente limitado como nutricionalmente excesivo pueden conducir a una obesidad posterior (Dabelea et al., 2011).

En ovinos un conjunto de trabajos ha aportado información muy valiosa sobre los efectos de programación fetal sobre la adiposidad de la progenie (Bispham et al., 2003; Sharkey et al., 2009; Whorwood et al., 2001). Estas investigaciones indican que una reducción en la cantidad de alimentos consumidos por la madre durante la primera mitad de la gestación a cantidades subóptimas da como resultado una mayor deposición de grasa en el feto a término (Bispham et al., 2003). A su vez estos trabajos sugieren que los efectos adversos a largo plazo no se observarían hasta que la descendencia se volviera obesa y alcanzara la adultez temprana (Sharkey et al., 2009). Según estos trabajos, los componentes clave del desarrollo del tejido adiposo fetal que causarían estos efectos de mayor acumulación adiposa en la vida adulta serían una combinación de una mayor acción de los glucocorticoides (Whorwood et al., 2001) y una mayor acumulación de adipocitos blancos, en lugar de marrones, durante el desarrollo prenatal intrauterino (Bispham et al., 2003).

De este modo nuestros resultados podrían indicar que la subnutrición incidió en un aumento en la cantidad de adipocitos intramusculares presentes en las ovejas a los 7 años de vida.

Una posible explicación para estos hallazgos podría relacionarse también con diferencias en el grado de envejecimiento muscular entre animales BOF y AOF. Esto está relacionado con el hecho de que se encuentra aceptado que a medida que el envejecimiento avanza se producen cambios importantes en la estructura y la función de los músculos esqueléticos que en general se caracterizan por una reducción en la masa muscular, la pérdida de actividad oxidativa mitocondrial y un cambio en el metabolismo muscular de los lípidos (Akima et al. 2001; Crane et al. 2009; DeNino et al. 2001; Kent-Braun et al. 2000; Overend et al. 1992; Schwenzer et al. 2009). En ese mismo sentido, se ha propuesto que conforme la atrofia muscular por envejecimiento avanza, los músculos experimentan un aumento anormal en la infiltración de tejido adiposo intramuscular (Boettcher et al. 2009; Goodpaster et al. 2000; Song et al. 2004). A su vez, muy interesantemente y consistentemente con nuestros hallazgos también, algunos investigadores han propuesto que el aumento en la cantidad de adipocitos intramusculares que se produce con el envejecimiento podría ser músculo dependiente. Por ejemplo, Akima et al. (2011) midieron el contenido de grasa intramuscular en diferentes músculos del muslo utilizando resonancia magnética en niños con distrofia muscular de Duchenne y demostraron que el contenido de grasa intramuscular difería entre músculos, lo que, según estos autores, sugiere que los aumentos de grasa intramuscular asociados con la edad también pueden diferir entre músculos o grupos musculares. De forma similar, Ramsay et al. (2011) estudiaron el contenido de grasa intramuscular en el lado parético y no parético de los muslos en pacientes con hemiplejia, y los resultados mostraron que los patrones de infiltración de tejido adiposo eran diferentes entre músculos o grupos musculares. Más recientemente, Akima et al. (2015) realizaron un estudio con pacientes humanos de dos grupos etarios contrastantes (70 y 20 años de edad aproximadamente) y les determinaron el contenido de grasa intramuscular en diversos músculos del muslo

utilizando resonancia magnética y demostraron que la cantidad de grasa intramuscular aumenta con la edad pero que esos cambios pueden ser músculo-dependientes. Como se comentó antes, estos resultados podrían ser consistentes con nuestros hallazgos que indican que en las ovejas de edad avanzada del presente estudio los cambios en los adipocitos intramusculares producidos por el tratamiento se evidenciaron exclusivamente en el *Semitendinosus* y no en los demás músculos estudiados.

Por otra parte, en nuestro presente estudio se detectó un efecto de triple interacción entre tratamiento, músculo y tipo de parto, que una vez más sugiere que los efectos de programación fetal sobre el desarrollo muscular (en este caso específicamente sobre los adipocitos intramusculares) podrían ser distintos según se trate de individuos gestados como únicos o como mellizos. Una vez más, de forma de algún modo consistente con lo que sucedió con los pesos musculares, nuestros resultados indicaron que los adipocitos intramusculares fueron afectados por el tipo de parto solamente cuando se trató de ovejas del grupo no subnutrido, mientras que las diferencias entre ovejas simples y dobles no se evidenciaron dentro de los animales del grupo BOF. Esto, como se comentó antes, podría estar relacionado con el hecho de que la subnutrición materna de alguna manera elimina las diferencias que naturalmente existen entre fetos simples y mellizos al equiparar las tasas de crecimiento de estos individuos cuando los mismos se gestan en condiciones restrictivas (Todd et al., 2009).

En síntesis, los resultados del presente trabajo sugieren que una subnutrición inducida por una menor oferta de forraje de campo natural desde antes de la concepción hasta aproximadamente un mes antes del parto, no altera la PAS positividad fibrilar en músculos esqueléticos de ovejas de edad avanzada. No obstante, los resultados de esta tesis sugieren que la subnutrición prenatal podría afectar la distribución y morfometría de los adipocitos intramusculares con un aumento en el número de células adiposas, aunque de menor tamaño, en algunos músculos de ovejas nacidas de madres subnutridas. Asimismo, los resultados de la presente tesis sugieren que los efectos de programación fetal por subnutrición a largo plazo sobre la distribución y morfometría de los adipocitos intramusculares podrían diferir según el músculo y según el tipo de parto o gestación.

7. CONCLUSIONES

Una subnutrición inducida por una menor oferta de forraje de campo natural desde la peri concepción hasta un mes antes del parto no afectó el peso de los órganos, (exceptuando los riñones) en ovejas de edad avanzada. A su vez, los resultados de esta tesis demuestran que tanto del peso de algunos órganos como el peso de los músculos y la distribución y morfometría de los adipocitos intramusculares podrían ser afectados por la subnutrición prenatal con cambios evidenciables en animales de edad avanzada, aunque la mayoría de estos efectos dependerían del tipo de parto o gestación y del músculo en el cual fueran evaluados.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abud, M. J., Bielli, A., Ithurralde, J., Freitas-de-Melo, A., Álvarez-Oxiley, A., López-Pérez, Á., Ungerfeld, R., & Pérez-Clariget, R. (2020). Forage allowances offered to pregnant ewes until middle and late gestation: Organ priorities on foetus development. *South African Journal of Animal Science, 50*(3), 471-480.

Akazawa, N., Kishi, M., Hino, T., Tsuji, R., Tamura, K., Hioka, A., & Moriyama, H. (2020). Relationship between aging and intramuscular adipose tissue in older inpatients. *Journal of the American Medical Directors Association, 22*(6), 1287-1291.e1.

Akima, H., Kano, Y., Enomoto, Y., Ishizu, M., Okada, M., Oishi, Y., Katsuta, S., & Kuno, S. (2001). Muscle function in 164 men and women aged 20--84 yr. *Medicine and Science in Sports and Exercise, 33*(2), 220-226.

Akima, H., Lott, D., Senesac, C., Deol, J., Germain, S., Arpan, I., Bendixen, R., Lee Sweeney, H., Walter, G., & Vandenborne, K. (2011). Relationships of thigh muscle contractile and non-contractile tissue with function, strength, and age in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*, 22(1), 16-25.

Akima, H., Yoshiko, A., Hioki, M., Kanehira, N., Shimaoka, K., Koike, T., Sakakibara, H., & Oshida, Y. (2015). Skeletal muscle size is a major predictor of intramuscular fat content regardless of age. *European Journal of Applied Physiology, 115*(8), 1627-1635.

Alwasel, S. H. (2017). Glomerular filtration barrier in rat offspring exposed to maternal undernutrition. *Journal of King Saud University. Science, 29*(2), 206-213.

Barker, D. (2002). Fetal programming of coronary heart disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *13*(9), 364-368.

Barker, D. J. (1997). The fetal origins of coronary heart disease. *Acta Paediatrica*, *86*(422 Suppl.), 78-82.

Barker, D. J. (1998). In utero programming of chronic disease. *Clinical Science*, *95*(2), 115-128.

Barker, D. J. P., & Hanson, M. A. (2004). Altered regional blood flow in the fetus: the origins of cardiovascular disease? *Acta Pediátrica*, *93*(12), 1559-1560.

Barker, D. J., & Osmond, C. (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*, 1(8489), 1077-1081.

Barker, D.J.P. (1998). *Mother, babies and health in later life* (2ª ed.). Churchill Livingstone.

Bauer, R., Walter, B., Brust, P., Füchtner, F., & Zwiener, U. (2003). Impact of asymmetric intrauterine growth restriction on organ function in newborn piglets. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 110, S40–S49. https://doi.org/10.1016/s0301-2115(03)00171-4

Bauer, R., Wank, V., Walter, B., Blickhan, R., & Zwiener, U. (2000). Reduced muscle vascular resistance in intrauterine growth restricted newborn piglets. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *52*(3), 271-276.

Bauman, D. E., Eisemann, J. H., & Currie, W. B. (1982). Hormonal effects on partitioning of nutrients for tissue growth: role of growth hormone and prolactin. *Federation Proceedings, 41*(9), 2538-2544.

Bielli, A., Pérez, R., Pedrana, G., Milton, J. T. B., Lopez, A., Blackberry, M. A., Duncombe, G., Rodriguez-Martinez, H., & Martin, G. B. (2002). Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reproduction, Fertility, and Development, 14*(5-6), 333-337.

Bispham, J., Gopalakrishnan, G. S., Dandrea, J., Wilson, V., Budge, H., Keisler, D. H., Broughton Pipkin, F., Stephenson, T., & Symonds, M. E. (2003). Maternal endocrine adaptation throughout pregnancy to nutritional manipulation: consequences for maternal plasma leptin and cortisol and the programming of fetal adipose tissue development. *Endocrinology, 144*(8), 3575-3585.

Boettcher, M., Machann, J., Stefan, N., Thamer, C., Häring, H.-U., Claussen, C. D., Fritsche, A., & Schick, F. (2009). Intermuscular adipose tissue (IMAT): association with other adipose tissue compartments and insulin sensitivity. *Journal of Magnetic Resonance Imaging, 29*(6), 1340-1345.

Bravo, Silvana, & Sepúlveda, Néstor. (2010). Índices Zoométricos en Ovejas Criollas Araucanas. *International Journal of Morphology*, *28*(2), 489-495. https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022010000200025

Bribiescas, R. G. (2001). Reproductive ecology and life history of the human male. *American Journal of Physical Anthropology*, *116*(Suppl. 33), 148-176.

Calkins, K., & Devaskar, S. U. (2011). Fetal origins of adult disease. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care, 41*(6), 158-176.

Casanello, P., Krause, B. J., Castro-Rodriguez, J. A., & Uauy, R. (2015). Programación fetal de enfermedades crónicas: conceptos actuales y epigenética. *Revista chilena de pediatria, 86*(3), 135-137. https://doi.org/10.1016/j.rchipe.2015.06.008

Casas, M. (2009). *Miogénesis y diversidad muscular*. https://es.slideshare.net/Pauli.olivares/miogenesis-y-diversidad-muscular

Close, W. H., & Pettigrew, J. E. (1990). Mathematical models of sow reproduction. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 40, 83-88.

Crane, J. D., Devries, M. C., Safdar, A., Hamadeh, M. J., & Tarnopolsky, M. A. (2009). The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences, 65*(2), 119-128.

Dabelea, D., & Crume, T. (2011). Maternal environment and the transgenerational cycle of obesity and diabetes. *Diabetes, 60*(7), 1849-1855.

Daniel, Z. C. T. R., Brameld, J. M., Craigon, J., Scollan, N. D., & Buttery, P. J. (2007). Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on lamb carcass characteristics and muscle fiber composition1. *Journal of Animal Science, 85*(6), 1565-1576.

Daugaard, J. R., & Richter, E. A. (2001). Relationship between muscle fibre composition, glucose transporter protein 4 and exercise training: possible consequences in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Physiologica Scandinavica, 171*(3), 267-276.

de Boo, H. A., & Harding, J. E. (2006). The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *The Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology, 46*(1), 4-14.

DeNino, W. F., Tchernof, A., Dionne, I. J., Toth, M. J., Ades, P. A., Sites, C. K., & Poehlman, E. T. (2001). Contribution of abdominal adiposity to age-related differences in insulin sensitivity and plasma lipids in healthy nonobese women. *Diabetes Care, 24*(5), 925-932.

Desai, M., Crowther, N. J., Lucas, A., & Hales, C. N. (1996). Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *The British Journal of Nutrition, 76*(4), 591-603.

Dos Santos, J. M., Moreli, M. L., Tewari, S., & Benite-Ribeiro, S. A. (2015). The effect of exercise on skeletal muscle glucose uptake in type 2 diabetes: An epigenetic perspective. *Metabolism: Clinical and Experimental, 64*(12), 1619-1628.

Du, M., Huang, Y., Das, A. K., Yang, Q., Duarte, M. S., Dodson, M. V., & Zhu, M.-J. (2012). Meat Science and Muscle Biology Symposium: manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. *Journal of Animal Science, 91*(3), 1419-1427.

Du, M., Huang, Y., Das, A. K., Yang, Q., Duarte, M. S., Dodson, M. V., & Zhu, M.-J. (2013). Meat Science and Muscle Biology Symposium: manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle1,2. *Journal of Animal Science, 91*(3), 1419-1427.

Du, M., Wang, B., Fu, X., Yang, Q., & Zhu, M.-J. (2015). Fetal programming in meat production. *Meat Science*, *109*, 40-47.

Edwards, L. J., McFarlane, J. R., Kauter, K. G., & McMillen, I. C. (2004). Impact of periconceptional nutrition on maternal and fetal leptin and fetal adiposity in singleton and twin pregnancies. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 288*(1), R39-45.

Edwards, L. J., & McMillen, I. C. (2002a). Impact of maternal undernutrition during the periconceptional period, fetal number, and fetal sex on the development of the hypothalamo-pituitary adrenal axis in sheep during late Gestation1. *Biology of Reproduction, 66*(5), 1562-1569.

Edwards, L. J., & McMillen, I. C. (2002b). Periconceptional nutrition programs development of the cardiovascular system in the fetal sheep. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 283*(3), R669-79.

Faa, G., Manchia, M., Pintus, R., Gerosa, C., Marcialis, M. A., & Fanos, V. (2016). Fetal programming of neuropsychiatric disorders. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews, 108*(3), 207-223. https://doi.org/10.1002/bdrc.21139

Fahey, A. J., Brameld, J. M., Parr, T., & Buttery, P. J. (2005). The effect of maternal undernutrition before muscle differentiation on the muscle fiber development of the newborn lamb. *Journal of Animal Science, 83*(11), 2564-2571.

Friedman, J. E. (2018). Developmental programming of obesity and diabetes in mouse, monkey, and man in 2018: Where are we headed? *Diabetes, 67*(11), 2137-2151.

Frigolet, M. E., & Gutiérrez-Aguilar, R. (2020). The colors of adipose tissue. *Gaceta Medica de Mexico, 156*(2), 142-149.

Gao, F. & Liu, Y.C. & Hou, X.Z. (2009). Effect of Maternal Undernutrition during Late Pregnancy on Growth and Development of Ovine Fetal Visceral Organs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 22*(12), 1633-1639. https://doi.org/10.5713/ajas.2009.90131

García M.P, Arenas G.R. (2018) Hotchkiss y McManus y la tinción de PAS. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica, 16*(2),168-170.

García-Robles, R., Ayala, P., Perdomo, S. (2012). Epigenetics: Definition, molecular bases and implications in human health and evolution. *Revista Ciencias de la Salud*, 10, 59-71.

Gaster, M., Staehr, P., Beck-Nielsen, H., Schrøder, H. D., & Handberg, A. (2001). GLUT4 is reduced in slow muscle fibers of type 2 diabetic patients: is insulin resistance in type 2 diabetes a slow, type 1 fiber disease? *Diabetes, 50*(6), 1324-1329.

Genovese, P., Núñez, M. E., Pombo, C., & Bielli, A. (2009). Undernutrition during foetal and post-natal life affects testicular structure and reduces the number of Sertoli cells in the adult rat. Zuchthygiene. *Reproduction in Domestic Animals, 45*(2), 233-236.

Gluckman, P. D., Hanson, M. A., & Beedle, A. S. (2007). Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *American Journal of Human Biology*, *19*(1), 1-19.

Godfrey, K. M. (2002). The role of the placenta in fetal programming-a review. *Placenta, 23*(Suppl. A), S20-S27.

Godfrey, K. M., Haugen, G., Kiserud, T., Inskip, H. M., Cooper, C., Harvey, N. C. W., Crozier, S. R., Robinson, S. M., Davies, L., Southampton Women's Survey Study Group, & Hanson, M. A. (2012). Fetal liver blood flow distribution: role in human developmental strategy to prioritize fat deposition versus brain development. *PloS One, 7*(8), e41759.

Goodpaster, B. H., Kelley, D. E., Thaete, F. L., He, J., & Ross, R. (2000). Skeletal muscle attenuation determined by computed tomography is associated with skeletal muscle lipid content. *Journal of Applied Physiology*, *89*(1), 104-110.

Goodpaster, B. H., Thaete, F. L., & Kelley, D. E. (2000). Thigh adipose tissue distribution is associated with insulin resistance in obesity and in type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Clinical Nutrition, 71*(4), 885-892.

Gootwine, E., Spencer, T. E., & Bazer, F. W. (2007). Litter-size-dependent intrauterine growth restriction in sheep. *Animal*, *1*(4), 547-564.

Graziotti, G., Rios, C., & Basso, L. (2000). Las fibras musculares esqueléticas y la producción de carne de cerdo. *Revista Argentina de Producción Animal 20*(2), 145-159

Greenwood, P. L., Slepetis, R. M., & Bell, A. W. (2000). Influences on fetal and placental weights during mid to late gestation in prolific ewes well-nourished throughout pregnancy. *Reproduction, Fertility, and Development, 12*(3-4), 149-156.

Hales, C., & Barker, D. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *International Journal of Epidemiology, 42*(5), 1215-1222.

Harding, J. E. (1997). Periconceptual nutrition determines the fetal growth response to acute maternal undernutrition in fetal sheep of late gestation. *Prenatal and Neonatal Medicine*, 2, 310-319.

Hausman, G. J., Basu, U., Du, M., Fernyhough-Culver, M., & Dodson, M. V. (2014). Intermuscular and intramuscular adipose tissues: Bad vs. good adipose tissues. *Adipocyte, 3*(4), 242-255.

He, J., Watkins, S., & Kelley, D. E. (2001). Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity*. Diabetes, 50*(4), 817-823.

Ingram, K. H., Lara-Castro, C., Gower, B. A., Makowsky, R., Allison, D. B., Newcomer, B. R., Munoz, A. J., Beasley, T. M., Lawrence, J. C., Lopez-Ben, R., Rigsby, D. Y., & Garvey, W. T. (2011). Intramyocellular lipid and insulin resistance: Differential relationships in European and African Americans. *Obesity*, 19(7), 1469-1475.

Ithurralde, J. (2022). *Efecto de la oferta de forraje de campo natural gestacional sobre el desarrollo muscular de corderos* [Tesis de doctorado, Facultad de Agronomía, UdelaR]. Colibrí. https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/35714

Ithurralde J., Bianchi G., Feed O., Nan F., Ballesteros F., Garibotto G., & Bielli A. (2020). The effects of hot boning on meat quality from six different contractile-metabolic sheep muscles: a preliminary study. *Journal of Food Processing and Preservation, 44*(10), e14778.

Ithurralde, J., Bianchi, G., Feed, O., Nan, F., Garibotto, G., & Bielli, A. (2015). Histochemical fiber types in 16 heavy-lamb skeletal muscles. *Small Ruminant Research* 125, 88-92.

Ithurralde, J., Pérez-Clariget, R., Abud, M. J., Álvarez-Oxiley, A., Casal, A., Astessiano, A. L., & Bielli, A. (2023). Maternal undernutrition induced by a lower natural pasture allowance affects muscle characteristics in newborn lambs. *Small Ruminant Research*, *229*(3), 107124. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2023.107124

Ithurralde, J., Pérez-Clariget, R., Corrales, F., Fila, D., López-Pérez, Á., Marichal, M. de J., Saadoun, A., & Bielli, A. (2019). Sex-dependent effects of maternal undernutrition on growth performance, carcass characteristics and meat quality of lambs. *Livestock Science*, *221,* 105-114.

Ithurralde, J., Pérez-Clariget, R., Saadoun, A., Genovese, P., Cabrera, C., López, Y., Feed, O., & Bielli, A. (2021). Gestational nutrient restriction under extensive grazing conditions: Effects on muscle characteristics and meat quality in heavy lambs. *Meat Science*, *179*, 108532.

Jansson, T., & Powell, T. L. (2007). Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clinical Science*, 113(1), 1-13.

Kent-Braun, J. A., Ng, A. V., & Young, K. (2000). Skeletal muscle contractile and noncontractile components in young and older women and men. *Journal of Applied Physiology*, 88(2), 662-668.

Kenyon, P. R., & Blair, H. T. (2014). Fetal programming in sheep – Effects on production. *Small Ruminant Research*, 118(1-3), 16-30.

Kulkarni, B., Hills, A. P., & Byrne, N. M. (2014). Nutritional influences over the life course on lean body mass of individuals in developing countries. *Nutrition Reviews, 72*(3), 190-204.

Kuzawa, C. W., McDade, T. W., Adair, L. S., & Lee, N. (2010). Rapid weight gain after birth predicts life history and reproductive strategy in Filipino males. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107*(39), 16800-16805.

Lee, S. H., Joo, S. T., & Ryu, Y. C. (2010). Skeletal muscle fiber type and myofibrillar proteins in relation to meat quality. *Meat Science, 86*(1), 166-170.

Lefaucheur, L. (2010). A second look into fibre typing--relation to meat quality. *Meat Science, 84*(2), 257-270. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.05.004

Lefaucheur, L., & Gerrard, D. (2000) Muscle fiber plas-ticity in farm mammals. *Proceedings of the American society of animal science*, 256, 58-67.

Legault, L.-M., Bertrand-Lehouillier, V., & McGraw, S. (2018). Pre-implantation alcohol exposure and developmental programming of FASD: an epigenetic perspective. *Biochemistry and Cell Biology, 96*(2), 117-130.

Lie, S., Morrison, J. L., Williams-Wyss, O., Suter, C. M., Humphreys, D. T., Ozanne, S. E., Zhang, S., Maclaughlin, S. M., Kleemann, D. O., Walker, S. K., Roberts, C. T., & McMillen, I. C. (2014). Periconceptional undernutrition programs changes in insulin-signaling molecules and microRNAs in skeletal muscle in singleton and twin fetal sheep. *Biology of Reproduction, 90*(1), 5.

Long, N. M., Tousley, C. B., Underwood, K. R., Paisley, S. I., Means, W. J., Hess, B. W., Du, M., & Ford, S. P. (2012). Effects of early- to mid-gestational undernutrition with or without protein supplementation on offspring growth, carcass characteristics, and adipocyte size in beef cattle. *Journal of Animal Science, 90*(1), 197-206.

Maccatrozzo, L., Patruno, M., Toniolo, L., Reggiani, C., & Mascarello, F. (2004). Myosin heavy chain 2B isoform is expressed in specialized eye muscles but not in trunk and limb muscles of cattle. *European Journal of Histochemistry*, *48*(4), 357-366.

McLeod, M., Breen, L., Hamilton, D. L., & Philp, A. (2016). Live strong and prosper: the importance of skeletal muscle strength for healthy ageing. *Biogerontology*, 17, 497-510.

McMillen, I. C., Adams, M. B., Ross, J. T., Coulter, C. L., Simonetta, G., Owens, J. A., Robinson, J. S., & Edwards, L. J. (2001). Fetal growth restriction: adaptations and consequences. *Reproduction, 122*(2), 195-204.

Mendoza, P. G., & Guzmán, R. A. (2018). Hotchkiss y McManus y la tinción de PAS. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, *16*(2), 168-170. https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182o.pdf

Moore, V. M., Miller, A. G., Boulton, T. J., Cockington, R. A., Craig, I. H., Magarey, A. M., & Robinson, J. S. (1996). Placental weight, birth measurements, and blood pressure at age 8 years. *Archives of Disease in Childhood, 74*(6), 538-541.

Myatt, L. (2006). Placental adaptive responses and fetal programming. *The Journal of Physiology, 572*(1), 25-30.

Nathanielsz, P. W., & Hanson, M. A. (2003). The fetal dilemma: spare the brain and spoil the liver. *The Journal of Physiology, 548*(2), 333.

Newnham, J. P., Kelly, R. W., Patterson, L., & James, I. (1991). The influence of maternal undernutrition in ovine twin pregnancy on fetal growth and Doppler flow-velocity waveforms. *Journal of Developmental Physiology, 16*(5), 277-282.

Nwagwu, M. O., Cook, A., & Langley-Evans, S. C. (2000). Evidence of progressive deterioration of renal function in rats exposed to a maternal low-protein diet in utero. *The British Journal of Nutrition, 83*(1), 79-85.

Nyholm, B., Qu, Z., Kaal, A., Pedersen, S. B., Gravholt, C. H., Andersen, J. L., Saltin, B., & Schmitz, O. (1997). Evidence of an increased number of type IIb muscle fibers in insulin-resistant first-degree relatives of patients with NIDDM. *Diabetes, 46*(11), 1822-1828.

Overend, T. J., Cunningham, D. A., Kramer, J. F., Lefcoe, M. S., & Paterson, D. H. (1992). Knee extensor and knee flexor strength: cross-sectional area ratios in young and elderly men. *Journal of Gerontology, 47*(6), M204-10.

Papadopoulou, S. K. (2020). Sarcopenia: a contemporary health problem among older adult populations. *Nutrients, 12*(5), 1293.

Parsons, T. J., Power, C., & Manor, O. (2001). Fetal and early life growth and body mass index from birth to early adulthood in 1958 British cohort: longitudinal study. *BMJ*, 323, 1331-1335.

Patel, H. P., Syddall, H. E., Martin, H. J., Stewart, C. E., Cooper, C., & Sayer, A. A. (2010). Hertfordshire sarcopenia study: design and methods. *BMC geriatrics*, 10, 1-7.

Pérez-Clariget, R., Corrales-Hlinka, M. F., López-Pérez, M. B., & Jorge-Smeding, E. (2023). Nutrient restriction during pregnancy and litter size affect the feeding behaviour, feed preference and welfare of the aged ewe's offspring. *Small Ruminant Research*, 226, 107025.

Pérez-Pedregosa, J., Martínez G. M. T., del Pino, S.R. S., Gutiérrez-Larraya, A. F.Medina, M. L., Bueso, M. T., & Cabrillo R. E. (2014). Diagnóstico prenatal y evolución en fetos con agenesia de ductus venoso. *Revista chilena de obstetricia y ginecología, 79*(3), 173-181.

Phillips, I. D., Simonetta, G., Owens, J. A., Robinson, J. S., Clarke, I. J., & McMillen, I. C. (1996). Placental restriction alters the functional development of the pituitary-adrenal axis in the sheep fetus during late gestation. *Pediatric Research, 40*(6), 861-866.

Piaggio L. (2014). Suplementación de la recría y engorde de ovinos sobre campo natural. En *Seminario de Actualización Técnica: Producción de Carne Ovina de Calidad* (pp. 4554). INIA

Picard, B., Lefaucheur, L., Berri, C., & Duclos, M. J. (2002). Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reproduction, Nutrition, Development, 42*(5), 415-431.

Pillai, S. M., Jones, A. K., Hoffman, M. L., McFadden, K. K., Reed, S. A., Zinn, S. A., & Govoni, K. E. (2017). Fetal and organ development at gestational days 45, 90, 135 and at birth of lambs exposed to under-or over-nutrition during gestation. *Translational Animal Science*, 1, 16-25.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, *284*(5411), 143-147. https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143

Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Melchior, K., Rohde, W., & Dörner, G. (2000). Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *The Journal of Nutrition, 130*(10), 2582-2589. https://doi.org/10.1093/jn/130.10.2582

Porrello, E. R., Widdop, R. E., & Delbridge, L. M. D. (2008). Early origins of cardiac hypertrophy: does cardiomyocyte attrition programme for pathological "catch-up" growth of the heart? *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology, 35*(11), 1358-1364.

Poulsen, P., Kyvik, K. O., Vaag, A., & Beck-Nielsen, H. (1999). Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study. *Diabetologia, 42*(2), 139-145.

Rahemi, H., Nigam, N., & Wakeling, J. M. (2015). The effect of intramuscular fat on skeletal muscle mechanics: implications for the elderly and obese. *Journal of the Royal Society, Interface, 12*(109), 20150365.

Ramírez, M., Testa, L. M., López Valiente, S., Latorre, M. E., Long, N. M., Rodriguez, A. M., Pavan, E., & Maresca, S. (2020). Maternal energy status during late gestation: Effects on growth performance, carcass characteristics and meat quality of steers progeny. *Meat Science*, *164*, 108095.

Ramsay, J. W., Barrance, P. J., Buchanan, T. S., & Higginson, J. S. (2011). Paretic muscle atrophy and non-contractile tissue content in individual muscles of the post-stroke lower extremity. *Journal of Biomechanics, 44*(16), 2741-2746.

Reed, S. A., Raja, J. S., Hoffman, M. L., Zinn, S. A., & Govoni, K. E. (2014). Poor maternal nutrition inhibits muscle development in ovine offspring. *Journal of Animal Science and Biotechnology, 5*(1), 43.

Rehfeldt, C., Lefaucheur, L., Block, J., Stabenow, B., Pfuhl, R., Otten, W., Metges, C. C., & Kalbe, C. (2012). Limited and excess protein intake of pregnant gilts differently affects body composition and cellularity of skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue of newborn and weanling piglets. *European Journal of Nutrition, 51*(2), 151-165.

Ross, M., & Wojciech, P. (2008). *Histología: texto y atlas color con biología celular y mo lecular*. Editorial Médica Panamericana.

Rumball, C. W. H., Harding, J. E., Oliver, M. H., & Bloomfield, F. H. (2008). Effects of twin pregnancy and periconceptional undernutrition on maternal metabolism, fetal growth and glucose-insulin axis function in ovine pregnancy: Effects of twinning and undernutrition on ovine pregnancies. *The Journal of Physiology, 586*(5), 1399-1411.

Sales, F., Peralta, O. A., Narbona, E., McCoard, S., De Los Reyes, M., González-Bulnes, A., & Parraguez, V. H. (2018). Hypoxia and oxidative stress are associated with reduced fetal growth in twin and undernourished sheep pregnancies. *Animals*, *8*(11), 217.

Sallout, B., & Walker, M. (2003). The fetal origin of adult diseases. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *23*(5), 555-560.

Schaart, G., Hesselink, R., Keizer, H., Kranenburg, G., Drost, M., & Hesselink, M. C. (2004). A modified PAS stain combined with immunofluorescence for quantitative analyses of glycogen in muscle sections. *Histochemistry and Cell Biology, 122*(2), 161-169.

Schwenzer, N. F., Martirosian, P., Machann, J., Schraml, C., Steidle, G., Claussen, C. D., & Schick, F. (2009). Aging effects on human calf muscle properties assessed by MRI at 3 Tesla. *Journal of Magnetic Resonance Imaging, 29*(6), 1346-1354.

Sharkey, D., Gardner, D. S., Fainberg, H. P., Sébert, S., Bos, P., Wilson, V., Bell, R., Symonds, M. E., & Budge, H. (2009). Maternal nutrient restriction during pregnancy

differentially alters the unfolded protein response in adipose and renal tissue of obese juvenile offspring. *FASEB Journal*, *23*(5), 1314-1324.

Sinclair, K. D., Allegrucci, C., Singh, R., Gardner, D. S., Sebastian, S., Bispham, J., Thurston, A., Huntley, J. F., Rees, W. D., Maloney, C. A., Lea, R. G., Craigon, J., McEvoy, T. G., & Young, L. E. (2007). DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104*(49), 19351-19356. https://doi.org/10.1073/pnas.0707258104

Snoeck, A., Remacle, C., Reusens, B., & Hoet, J. J. (1990). Effect of a Low Protein Diet during Pregnancy on the Fetal Rat Endocrine Pancreas. *Neonatology, 57*(2), 107-118. https://doi.org/10.1159/000243170

Song, M.-Y., Ruts, E., Kim, J., Janumala, I., Heymsfield, S., & Gallagher, D. (2004). Sarcopenia and increased adipose tissue infiltration of muscle in elderly African American women. *The American Journal of Clinical Nutrition, 79*(5), 874-880.

Swatland, H. J. (1975). Relationships between mitochondrial content and glycogen distribution in porcine muscle fibres. *The Histochemical Journal, 7*(5), 459-469.

Swatland, H. J. (1976). Cellular patterns of post-mortem glycogenolysis in longissimus dorsi muscles of pigs at different live weights. *The Histochemical Journal, 8*(5), 455-461.

Swatland, H. J. (1984). Muscle fiber differentiation and neuromuscular relationships. En H. J. Swatland (ed.), *Structure and Development of Meat Animals* (pp. 201-254). Prentice-Hall.

Tchirikov, M., Kertschanska, S., & Schröder, H. J. (2003). Differential effects of catecholamines on vascular rings from ductus venosus and intrahepatic veins of fetal sheep. *The Journal of Physiology*, *548*(2), 519-526. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.034470

Todd, S. E., Oliver, M. H., Jaquiery, A. L., Bloomfield, F. H., & Harding, J. E. (2009). Periconceptional undernutrition of ewes impairs glucose tolerance in their adult offspring. *Pediatric Research, 65*(4), 409-413.

Todros, T., Sciarrone, A., Piccoli, E., Guiot, C., Kaufmann, P., & Kingdom, J. (1999). Umbilical Doppler waveforms and placental villous angiogenesis in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Obstetrics and Gynecology, 93*(4), 499-503.

Toscano, A. E., Manhães-de-Castro, R., & Canon, F. (2008). Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition*, 24(3), 270-278.

Tygesen, M. P., Harrison, A. P., & Therkildsen, M. (2007). The effect of maternal nutrient restriction during late gestation on muscle, bone and meat parameters in five-month-old lambs. *Livestock Science, 110*(3), 230-241.

Underwood, K. R., Tong, J. F., Price, P. L., Roberts, A. J., Grings, E. E., Hess, B. W., Means, W. J., & Du, M. (2010). Nutrition during mid to late gestation affects growth,

adipose tissue deposition, and tenderness in cross-bred beef steers. *Meat Science, 86*(3), 588-593.

Vo, T., & Hardy, D. B. (2012). Molecular mechanisms underlying the fetal programming of adult disease. *Journal of Cell Communication and Signaling, 6*(3), 139-153.

Vonnahme, K. A., Hess, B. W., Hansen, T. R., McCormick, R. J., Rule, D. C., Moss, G. E., Murdoch, W. J., Nijland, M. J., Skinner, D. C., Nathanielsz, P. W., & Ford, S. P. (2003). Maternal undernutrition from early- to mid-gestation leads to growth retardation, cardiac ventricular hypertrophy, and increased liver weight in the fetal sheep. *Biology of Reproduction, 69*(1), 133-140.

Wang J., Li X., Yang X., Sun Q., Huang R., Xing J., & Zhao R. (2011). Maternal dietary protein induces opposite myofiber type transition in Meishan pigs at weaning and finishing stages. *Meat Science, 89*(2), 221-227.

Wells, J. C. K., Dumith, S. C., Ekelund, U., Reichert, F. F., Menezes, A. M. B., Victora, C. G., & Hallal, P. C. (2012). Associations of intrauterine and postnatal weight and length gains with adolescent body composition: prospective birth cohort study from Brazil. *The Journal of Adolescent Health*, *51*(6 Suppl.), S58-64.

Whorwood, C. B., Firth, K. M., Budge, H., & Symonds, M. E. (2001). Maternal undernutrition during early to midgestation programs tissue-specific alterations in the expression of the glucocorticoid receptor, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms, and type 1 angiotensin ii receptor in neonatal sheep. *Endocrinology, 142*(7), 2854-2864.

Wilson, S. J., McEwan, J. C., Sheard, P. W., & Harris, A. J. (1992). Early stages of myogenesis in a large mammal: formation of successive generations of myotubes in sheep tibialis cranialis muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility, 13*(5), 534-550.

Woods, L. L., Ingelfinger, J. R., Nyengaard, J. R., & Rasch, R. (2001). Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatric Research, 49*(4), 460-467.

Xie, Z., Dong, Q., Ge, J., Chen, P., Li, W., & Hu, J. (2012). Effect of low birth weight on impaired renal development and function and hypertension in rat model. *Renal Failure, 34*(6), 754-759.

Zandi-Nejad, K., Luyckx, V. A., & Brenner, B. M. (2006). Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. *Hypertension, 47*(3), 502-508.

Zhang, Y., Otomaru, K., Oshima, K., Goto, Y., Oshima, I., Muroya, S., Sano, M., Roh, S., & Gotoh, T. (2022). Maternal nutrition during gestation alters histochemical properties, and mRNA and microRNA expression in adipose tissue of Wagyu fetuses. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 797680. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.797680

Zhou, X., Yan, Q., Liu, L., Chen, G., Tang, S., He, Z., & Tan, Z. (2021). *Maternal undernutrition alters the skeletal muscle development and methylation of myogenic*

factors in progeny: A randomized controlled trial. Research Square. https://www.researchsquare.com/article/rs-169185/v1

Zhu, M. J., Ford, S. P., Means, W. J., Hess, B. W., Nathanielsz, P. W., & Du, M. (2006). Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *The Journal of Physiology, 575*(1), 241-250.

Zotte, A. D., Rémignon, H., & Chiericato, G. M. (2005). Influence of maternal feed rationing on metabolic and contractile properties of Longissimus lumborum muscle fibres in the rabbit offspring. *Meat Science, 70*(4), 573-577.