

Trabajo Fin de Máster

Efecto de la subnutrición materna periconcepcional
sobre los resultados reproductivos de ovejas y la
calidad oocitaria de sus corderas

Autor

Sandra Lobón Ascaso

Directores

José Alfonso Abecia Martínez
Adriana Casao Gascón

Facultad de Veterinaria
2013

ÍNDICE

I – RESUMEN.....	6
II – ABSTRACT.....	8
III – INTRODUCCIÓN.....	9
1. Efectos de la nutrición materna en el establecimiento de la gestación.....	9
1.1. Efectos sobre el desarrollo folicular.....	9
1.2. Efectos sobre la calidad del ovocito.....	11
1.3. Efectos sobre el funcionamiento luteal y el suministro de progesterona.....	11
1.4. Efecto de la nutrición en la calidad y desarrollo embrionario.....	13
2. Efectos de la nutrición materna en la descendencia.....	14
3. Mecanismos de los efectos nutricionales.....	15
IV – OBJETIVOS.....	17
V - MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
1. Instalaciones.....	18
2. Animales.....	18
3. Actividades.....	19
3.1. Sincronización del celo.....	19
3.2. Diagnóstico de gestación.....	19
3.3. Parámetros reproductivos.....	20
3.4. Pesaje de los corderos.....	20
3.5. Producción <i>in vitro</i> de embriones.....	20
3.5.1. Extracción ovocitos.....	20
3.5.2. Maduración.....	21
3.5.3. Fecundación.....	22
3.5.4. Cultivo de embriones.....	24
3.6. Análisis estadísticos.....	24

VI – RESULTADOS.....	26
1. Experimento 1.....	26
2. Experimento 2.....	29
VII – DISCUSIÓN.....	32
VIII – CONCLUSIONES.....	35
IX – BIBLIOGRAFÍA.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resultados reproductivos y productivos (media±E.S.) de ovejas alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 veces (B) las necesidades de mantenimiento 16 días antes de la cubrición y hasta 7 días después de la aparición del celo.....27

Tabla 2: Número (media±E.S.) (%) y calidad de los ovocitos de corderas de 2 meses de edad, provenientes de madres que fueron alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 (B) veces las necesidades de mantenimiento 16 días antes de la cubrición y hasta 7 días después de la aparición del celo correspondiente a la gestación de las corderas.....28

Tabla 3: Resultados de maduración, FIV y cultivo de embriones procedentes de ovocitos de corderas hijas de madres alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 (B) veces el mantenimiento 16 días antes de la cubrición y hasta 7 días después de la aparición del celo correspondiente a la gestación de las corderas.....28

Tabla 4: Resultados reproductivos y productivos (media±E.S.) de ovejas alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 veces (B) las necesidades de mantenimiento 16 días antes de la cubrición y hasta 15 días después de la aparición del celo.....30

Tabla 5: Número (media±E.S.) (%) y calidad de los ovocitos de corderas de 2 meses de edad, provenientes de madres que fueron alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 (B) veces las necesidades de mantenimiento 16 días antes de la cubrición y hasta 15 días después de la aparición del celo correspondiente a la gestación de las corderas.....31

Tabla 6: Resultados de maduración, FIV y cultivo de embriones procedentes de ovocitos de corderas hijas de madres alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 (B) veces el mantenimiento 16 días antes de la cubrición y hasta 15 días después de la aparición del celo correspondiente a la gestación de las corderas.....31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Evolución del PV y CC de ovejas alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 veces (B) el mantenimiento, desde la colocación de la esponja (PV1, CC1), en el momento del celo (PV2, CC2) y 7 días después de la aparición del celo (PV3, CC3). a, b: $p < 0,05$26

Figura 2: Evolución del PV y CC de ovejas alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 veces (B) el mantenimiento, desde la colocación de la esponja (PV1, CC1), en el momento del celo (PV2, CC2) y 15 días después de la aparición del celo (PV3, CC3). a, b: $p < 0,05$29

I. RESUMEN

Los objetivos de éste trabajo han sido estudiar el efecto de una subnutrición severa en los días previos y posteriores a la concepción sobre los parámetros reproductivos de las ovejas y conocer el posible efecto de esta subnutrición sobre la calidad ovocitaria de las corderas nacidas de dicha concepción. Para ello se realizaron dos experiencias en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, con procedimientos aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal.

Ochenta (experimento 1) y cuarenta (experimento 2) ovejas de raza Rasa Aragonesa se sincronizaron en celo mediante esponjas vaginales y la administración de 300 UI de eCG durante 14 días y fueron cubiertas a partir de las 36 horas de la retirada de las esponjas (celo=día 0). Desde el momento de la colocación de las esponjas y hasta el día 7 (experimento 1) ó 15 (experimento 2) después de los celos, las ovejas fueron alimentadas en grupo para cubrir 1,5 (grupo Control, C) o 0,5 (grupo Bajo, B) veces sus necesidades de mantenimiento (M). A partir del día 7 (experimento 1) ó del día 15 (experimento 2) las ovejas se reagruparon y fueron sometidas a la dieta 1,5 M hasta los partos. En este momento se registró el peso vivo al nacimiento de los corderos y se pesaron semanalmente hasta el momento del destete, con 40 días de edad.

Seis corderas en cada experimento, hijas de ovejas pertenecientes a los dos grupos nutricionales (3 por grupo) fueron sacrificadas a los dos meses de vida, se extrajeron sus ovarios y se recuperaron sus ovocitos, en cada uno de los experimentos. Estos ovocitos, una vez clasificados, se seleccionaron los aptos y se maduraron y fecundaron. De cada animal se registró el número de ovocitos recuperados tanto aptos como no aptos para la maduración. Las tasas de maduración y división se calcularon en función del número de ovocitos aptos y la tasa de fertilización se basó en el número de ovocitos madurados.

Las ovejas del lote control mantuvieron su peso vivo (PV) y condición corporal (CC) a lo largo de la experiencia, mientras que las subnutridas experimentaron una pérdida significativa ($p < 0,05$) tanto del PV como CC.

La subnutrición periconcepcional dio lugar a unos resultados reproductivos inferiores al lote control, con diferencias significativas para la prolificidad y fecundidad en el experimento 1 ($p < 0,05$) y con una tendencia a la significación ($p = 0,10$) para la fertilidad y fecundidad en el experimento 2. La duración de la media de la gestación fue similar en ambos lotes, así como la tasa machos/hembras nacidos. El PV medio de los corderos nacidos de las ovejas del lote B fue significativamente ($p < 0,05$) superior que los corderos del lote C, rozándose la significación al comparar los corderos del mismo sexo. Por el contrario, no hubo diferencias en el PV al destete ni en el crecimiento medio diario hasta ese momento. Respecto a la población oocitaria, las corderas hijas del lote B presentaron un mayor número de ovocitos a los dos meses de vida.

En conclusión, un nivel de subnutrición del 50% alrededor de la concepción se refleja negativamente sobre el rendimiento reproductivo, viéndose afectados parámetros como la prolificidad, fertilidad y fecundidad. Los corderos nacidos de madres pertenecientes al lote B presentan un PV medio superior. Las corderas nacidas de madres subnutridas presentan una alteración en la cantidad de ovocitos recuperados, siendo superior a las corderas nacidas de ovejas del lote C.

II. ABSTRACT

The aim of this work was to determine the effect of a severe undernutrition before and after conception on reproductive parameters of ewes and on the oocyte population of ewe lambs born after undernutrition. Two experiments were carried out at the *Servicio de Experimentación Animal* of the University of Zaragoza, with protocols approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation.

Eighty (experiment 1) and forty (experiment 2) Rasa Aragonesa ewes were fed to provide 1.5 (control group, C) or 0.5 (low group, L) times their maintenance requirements, from pessary insertion until 7 (exp. 1) or 15 (exp. 2) days after oestrus (day 0). From that moment to lambing, ewes were fed in group with the 1.5 diet. Six ewe lambs from each experiment were euthanized at 2 months of age and their oocyte quality studied.

Diets provoked a significant reduction ($p<0.05$) of live weight (LW) and body condition in the L group. Undernourished ewes presented a significant ($p<0.05$) lower litter size and fecundity in experiment 1, and a trend ($p=0.10$) for fertility and fecundity in experiment 2. Mean pregnancy length was similar in both groups, so that ratio males/females born.

Lambs from the L group had a significant higher LW at lambing ($p<0.05$), although no differences in LW at weaning or mean dairy LW gain were observed. Animals born from L ewes presented more oocytes than from C ewes ($p<0.05$), although percentages of healthy oocytes were similar. In conclusion, periconceptual maternal undernutrition produced a significant reduction of lamb production. Moreover, lambs from these ewes presented a significant higher LW at lambing and ewe lambs an alteration of oocyte quantity but no quality. These differences could have consequences in the adult life.

III. INTRODUCCIÓN

Los efectos de la nutrición sobre el rendimiento reproductivo de la especie ovina han sido estudiados ampliamente y sus conocimientos aplicados a los sistemas de producción animal para mejorar la productividad de las explotaciones. Tanto una alimentación restringida como una excesiva provocan efectos negativos en el rendimiento reproductivo, pudiéndose verse afectada la descendencia. En literatura relativamente antigua de medicina humana (Mellanby, 1933) ya se reconocen los efectos del estado nutricional antes del nacimiento sobre la salud o fisiología en la vida posterior.

Los rumiantes han sido objetos de muchos de estos estudios, ya que se crían con frecuencia en áreas de tierra marginales, en los que el aporte de nutrientes al suelo puede ser limitado y los animales criados en estos entornos podrían ser especialmente propensos a padecer deficiencias nutricionales, por lo que es interesante estudiar la subnutrición en este tipo de animales (Rhind, 2004).

La subnutrición podríamos definirla como alimentar a los animales por debajo de sus necesidades de mantenimiento (M). En el ovino el nivel clásico en experimentación es de 0,5 M y se compara con grupos 1 M ó 1,5 M. En muy pocos trabajos el umbral de subnutrición es menor a 0,5 M ya que niveles más bajos durante largos periodos de tiempo provocan efectos adversos significativos y además en numerosos países la legislación en materia de experimentación animal no lo permite. En nuestros experimentos el plano de alimentación para el grupo subnutrido es el clásico 0,5 M y el grupo control 1,5 M.

Los estudios iniciales de los efectos nutricionales maternos se han centrado generalmente en las etapas tardías de la gestación y en el periodo temprano del neonato (Gunn et al., 1995; Rhind et al., 1998b), ya que son en estas etapas en las que la demanda de nutrientes maternos es mayor para el crecimiento del feto o del neonato.

A pesar de que los requerimientos nutricionales fetales durante etapas tempranas son mucho menores, la nutrición materna puede influir en el desarrollo de los sistemas reproductivos fetales, por ejemplo en ovejas subnutridas en los siguientes periodos:

-Días 0-8 de gestación: Se observa una reducción del crecimiento embrionario. (Abecia et al. 1997)

-Días 0-11 de gestación: Se observa una reducción del crecimiento embrionario. (Rhind et al. 1989)

-Varios periodos del día 0-110 de gestación: Se observa un retraso en el desarrollo del ovario fetal en el 65 y 110 día de gestación. (Borwick et al. 1997, Rae et al. 2001)

-Días 0-95 de gestación: Se observa una reducción en la tasa de ovulación en adultos. (Rae et al. 2002)

Por ello, estudiar la subnutrición en la etapa periconcepcional puede resultar útil y con consecuencias importantes para el rendimiento reproductivo.

1. EFECTOS DE LA NUTRICIÓN MATERNA EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA GESTACIÓN:

1.1.-Efectos sobre el desarrollo folicular:

El desarrollo folicular, también conocido como foliculogénesis, es el proceso de crecimiento y desarrollo continuo de los folículos, que se inicia de forma temprana ya en la vida embrionaria. El crecimiento folicular se inicia antes de formarse el primer folículo primordial y continúa durante toda la vida neonatal y adulta. En función de su sensibilidad a las gonadotropinas, se pueden distinguir cinco clases de folículos:

Folículos primordiales, folículos comprometidos, folículos con respuesta a las gonadotropinas, folículos dependientes de gonadotropinas y folículos ovulatorios.

La mayoría de los estudios se han centrado en los efectos beneficiosos sobre el desarrollo folicular en lugar de los perjudiciales, por ejemplo la práctica del “Flushing” (periodos cortos de mejora nutricional antes de la cubrición) ha sido ampliamente utilizada por los ganaderos para aumentar la fertilidad.

Resultados de diversos experimentos relacionados con el desarrollo folicular y el estado nutricional:

- Varios estudios muestran que ovejas de mayor peso vivo (PV) y condición corporal (CC), comparadas con ovejas de menor PV y CC, tienen un mayor número de folículos de mayor diámetro (Rhind et al., 1989; Allison, 1977; Rhind y McNeilly, 1986; Boukhliq et al., 1996).
- En ovejas alimentadas con dietas 2M durante 6 días antes y durante la aparición de la ola de ovulación, el incremento de las concentraciones de glucosa, insulina y leptina se asocia con el aumento del número de folículos que crecen de 2 a 3 mm (Viñoles et al., 2005).
- Cuando el efecto de la subnutrición se investigó comparando ovejas 1,5M con 0,5M no se observó ningún efecto sobre los folículos estrogénicos. (Abecia et al., 1995, 1997).
- Comparando ovejas alimentadas *ad libitum* con ovejas en mantenimiento se observa una mayor población folicular pequeña (1-2,5mm) en las primeras y ninguna diferencia en el número de folículos grandes (>2,5mm) (Rhind y McNeilly, 1998).

1.2.-Efectos sobre la calidad del ovocito.

Los resultados de los estudios sobre el efecto del nivel de consumo de alimentos en la calidad del ovocito en ganado ovino son contradictorios, la mayoría de trabajos se han realizado usando el modelo de la oveja superovulada:

- Yaakub et al. (1997) observaron que una dieta baja altera la morfología de los ovocitos tanto en ovejas superovuladas como en ovejas sin superovular.
- Boland et al.(2001) no encontraron diferencias morfológicas en ovocitos recogidos de ovejas con dietas 0,5 M comparadas con dietas 2M.
- Lozano et al.(2003) observó un menor número de ovocitos buenos y embriones por animal tratado en ovejas superovuladas alimentadas *ad libitum* comparadas con ovejas control (1,5M) o dieta baja (0,5 M), llegando a la conclusión de que las dietas ad libitum son altamente perjudiciales para los programas de superovulación.
- McEvoy et al.(1995) que observó que niveles altos de alimentación en ovejas superovuladas disminuyeron la proporción de ovocitos en desarrollo más allá de la etapa de expansión del blastocito.

1.3. -Efectos sobre la funcionalidad luteal y el suministro de progesterona.

Variaciones en el rango fisiológico de las concentraciones de progesterona periférica debidas a factores de manejo como la nutrición puede inducir asincronía entre el embrión y el útero, lo que resulta en el fracaso para que se establezca la gestación (Lawson y Cahill, 1983). Sin embargo, investigaciones sobre la función de la progesterona en la mediación de estos efectos nutricionales han dado resultados contradictorios.

Se ha observado una relación inversa entre el nivel de nutrición y la progesterona periférica, en muestras tomadas de la yugular. (Rhind et al., 1989; Parr et al., 1982;

Lozano et al., 1998). También se ha visto que los pesos de los distintos cuerpos lúteos no se ven afectados por la subnutrición, y que la secreción *in vitro* de progesterona por el cuerpo lúteo, tanto de ovejas subnutridas como en las ovejas control, recogidas en los días 8, 9 y 14 del ciclo estral, es similar (Abecia et al. 1995, 1996, 1997, 1999)

En general, los datos son consistentes en cuanto al nivel nutricional y las concentraciones de progesterona periférica. Así, se ha observado una menor concentración de progesterona circulante en ovejas con un nivel de alimentación alto; si bien no se encontró ningún efecto, sí se observa un aumento de las tasas de pérdidas de embriones asociados con una mayor concentración de progesterona en ovejas subnutridas (Brien et al., 1981; Parr et al., 1987; McEvoy et al., 1995; O'Callaghan et al., 2000). Por otro lado, Parr (1992) demostró que las ovejas alimentadas con planos de alimentación altos tenían concentraciones más bajas de progesterona plasmática periférica debido al aumento en el metabolismo (*clearance*) de la progesterona, en lugar de los cambios en la tasa de secreción de la hormona del cuerpo lúteo.

Las relaciones anómalas entre el plano de nutrición, la concentración de la progesterona plasmática circulante y la supervivencia embrionaria hace plantearse el papel de la progesterona en la supervivencia del embrión y el valor de los niveles circulantes de progesterona como herramienta en el estudio de las relaciones entre nutrición y gestación.

De hecho, la ausencia de una asociación entre la progesterona y los niveles de mortalidad embrionaria llevaron a Rhind (1989) a sugerir que la explicación del papel de la progesterona en las pérdidas embrionarias requiere la medición de los perfiles de progesterona en la vena o en la arteria ovárica. Esto es apoyado por resultados obtenidos por Parr et al (1982) y Kleemann et al (1994), que indican que los cambios en el entorno hormonal del embrión temprano puede influir en su posterior desarrollo.

Desde la vena ovárica la progesterona puede pasar a la arteria ovárica, a través del mecanismo de contracorriente (Einer-Jensen y McCracken, 1981) y una rama de esta arteria llega al oviducto y al útero (Hunter, 1987), el suministro real de progesterona en el útero podría no estar relacionado con las concentraciones periféricas de esta hormona.

Por lo tanto, las concentraciones periféricas de progesterona pueden ser de poca importancia para el desarrollo del embrión.

La subnutrición puede actuar a través de cambios en la distribución de la progesterona en el endometrio. En un experimento diseñado para comparar las concentraciones de progesterona en venas ovárica y yugular, y en el tejido endometrial de ovejas gestantes y no gestantes (Abecia et al., 1996), las ovejas gestantes presentaban concentraciones similares de progesterona en la yugular, pero concentraciones mayores tanto en vena ovárica como en el tejido endometrial, en comparación con los animales que experimentaron ausencia total de embriones en el día 14 de gestación. Estos resultados no prueban que la diferencia de la progesterona contenida en el endometrio cause el fracaso de la gestación, pero confirma la hipótesis de los efectos perjudiciales de la progesterona durante el desarrollo embrionario y sugiere que la comprensión de los efectos de la nutrición en la gestación y la pérdida de embriones puede ser mejorada mediante la medición de las concentraciones de progesterona en la vena ovárica o en el endometrio.

No se ha observado efecto del nivel de nutrición sobre las concentraciones de progesterona en la vena ovárica ni en la vena uterina en cualquier día, aunque las concentraciones circulantes eran mayores y en el endometrio menores en el día 5 del ciclo en ovejas alimentadas 0,5 M (Lozano et al 1998). Este hallazgo proporciona un vínculo entre el conocimiento del papel de la progesterona en la supervivencia embrionaria por la modulación de la función uterina y las pérdidas de embriones mayores encontradas en ovejas subnutridas.

1.4. -Efecto de la nutrición en la calidad y desarrollo embrionario.

Tanto la sobrealimentación como las subalimentación han sido descritos como perjudiciales para el desarrollo embrionario. Se ha observado una mayor tasa de pérdidas de ovocitos en las ovejas que tenían una ingesta de alimentos restringida (0,5 M) en comparación con una alimentación adecuada (1,5M) durante los 14 días antes de la cubrición y 11 días posteriores (Rhind 1989).

Estudios del desarrollo de embriones *in vitro* (Creed et al., 1994), han demostrado una disminución de la tasa de desarrollo y viabilidad de los embriones recogidos el día 2 después de la fertilización con un aumento del nivel de alimentación de la hembra donadora durante el periodo de sincronización estral. Se concluyó que la nutrición durante la maduración de los ovocitos tiene efectos importantes sobre la viabilidad de los embriones en ovejas superovuladas. Wallace et al. (1994) no encontraron ningún efecto del nivel de nutrición desde el día 0 al día 16 del ciclo sobre la supervivencia embrionaria y llegaron a la conclusión de que tales efectos se ejercen antes de que el embrión entra en el útero o después de que el embrión ha superado con éxito la luteolisis. Abecia et al. (1997) observaron un retraso en el desarrollo de los embriones recogidos de ovejas subnutridas 8 días después de la cubrición. Utilizando las ovejas sacrificadas en el día 15 de gestación, Abecia et al. (1999) observaron un menor número de embriones en las ovejas restringidas, aunque sin diferencias en el número de blastocistos recuperados en el día 9 de gestación. Por lo tanto el efecto de la subnutrición sobre la tasa de gestación sólo se expresaría a partir de la segunda semana de gestación.

Este conjunto de experimentos preliminares llevó a la conclusión de que los efectos de la subnutrición sobre la supervivencia de los embriones no están necesariamente mediados a través de los cambios en la función ovárica de progesterona o a su llegada al útero, pero puede implicar cambios en el medio ambiente uterino resultando en diferentes patrones de señales embrión-oveja.

2. EFECTOS DE LA NUTRICIÓN MATERNA EN LA DESCENDENCIA

La subnutrición materna antes o durante la gestación puede alterar la función reproductiva de la descendencia. Los efectos pueden ejercerse en muchas etapas del desarrollo, y expresarse posteriormente.

Influencias nutricionales y endocrinas durante el desarrollo fetal o neonatal, potencialmente, pueden influir en el comportamiento reproductivo de las crías adultas pero también hay evidencia de que los efectos se pueden ejercer en generaciones posteriores, sobre el crecimiento fetal (Lumey, 1992), la fertilidad (Lummaa y Clutton-Brock, 2002) y el estado endocrino (Pollard, 1986), es decir la expresión de ciertos genes se pueden modificar no sólo en la generación F1, sino también en la F2 y las generaciones posteriores. Efectos nutricionales en la vida temprana pueden no producir necesariamente efectos perceptibles, pero pueden inducir efectos que se manifiestan en una etapa posterior de desarrollo y / o en la vida adulta.

Por ejemplo, Rae et al. (2001) demostraron que las diferencias físicas en el desarrollo fetal del ovario a los 110 días de gestación, cuando las madres eran alimentadas correctamente, fueron inducidas por las restricciones nutricionales maternas aplicadas 3 meses antes. En ese momento, las estructuras ováricas no estaban presentes, por lo que no podrían haber sido directamente afectadas; por otro lado, los tejidos precursores fueron aparentemente susceptibles a las influencias nutricionales. En estudios paralelos, períodos más prolongados de niveles similares de subnutrición materna demostraron una asociación con la reducción de las tasas de ovulación en la descendencia (Rae et al., 2002). Del mismo modo, Gallaher y col. (1998) demostraron que la subnutrición periconcepcional se asocia con perfiles endocrinos alterados, específicamente el patrón de plasma fetal ovino en las concentraciones de IGF-1 y IGFBP-3, en posteriores etapas del desarrollo fetal, con consecuencias para el desarrollo de los órganos reproductivos.

3. MECANISMOS DE LOS EFECTOS NUTRICIONALES

Las señales a través de las cuales las crías en desarrollo "leen" el estado nutricional de las madres son poco conocidas y se trata de una especulación en este momento, lo más probable es que muchas señales estén implicadas en diferentes etapas del desarrollo (Rhind et al., 2001, 2003).

Las señales fisiológicas supuestamente deben:

- Estar directa o indirectamente relacionadas con el estado nutricional de la madre.
- Ser capaces de alcanzar el órgano diana en las crías en desarrollo (esto puede significar que un factor relevante tiene que cruzar las membranas celulares, incluyendo la barrera sangre-cerebro o la placenta)
- Ejercer un efecto, directamente o indirectamente (por ejemplo, a través de diferencias en el hipotálamo, la hipófisis o la función hepática fetal) en las gónadas fetales, modificar la expresión de uno o más de una amplia gama de genes candidatos.

IV. OBJETIVOS

Ya que la subnutrición periconcepcional en la especie ovina provoca tasas de fertilidad reducidas, debido, entre otras causas, a una disminución de la calidad de los ovocitos y de la supervivencia embrionaria (Abecia et al., 2006) y que además, se ha demostrado que dicha subnutrición provoca cambios en la vida adulta de las crías, tanto a nivel metabólico (McMillen y Robinson, 2005) como reproductivo (Rhind et al., 1989), los objetivos de este trabajo son:

- a) Estudiar el efecto de una subnutrición severa en los días previos y posteriores a la concepción sobre los parámetros reproductivos de las ovejas.
- b) Conocer el posible efecto de esta subnutrición sobre los rendimientos productivos y la calidad ovocitaria de los corderos nacidos.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. INSTALACIONES

Se han realizado dos experimentos durante los meses de noviembre de 2012 a mayo de 2013 en el Servicio de Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza (41°N). Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por la Comisión Ética para la Experimentación animal de la Universidad de Zaragoza y el manejo de los animales estuvo de acuerdo a la normativa española de Protección de los Animales Utilizados para Experimentación y otros Fines Científicos (RD 1201/05), que a su vez sigue la Directiva 86/609 de la Unión Europea con el mismo nombre.

2. ANIMALES

-Experimento 1: 80 ovejas adultas de raza Rasa Aragonesa, con un PV medio (\pm D.S.) inicial de $58,0 \pm 0,6$ kg y una CC media (\pm D.S.) (Russell et al., 1969) de $3,00 \pm 0,02$.

-Experimento 2: 40 ovejas de la misma raza con un PV medio (\pm D.S.) de $66,0 \pm 0,6$ kg y una CC media (\pm D.S.) de $3,25 \pm 0,02$

→ Grupos experimentales de ovejas

Según la alimentación recibida desde la colocación de las esponjas hasta el día 7 (experimento 1) ó el día 15 después de las cubriciones (DIA 0) (experimento 2), las ovejas se dividieron en 2 grupos experimentales con la mitad del número de animales en cada grupo:

- Grupo Control (C, n= 40/ n=20): Fueron alimentadas para cubrir 1,5 veces sus necesidades de mantenimiento (1,5 M).
- Grupo Bajo (B, n= 40/n=20): Fueron alimentadas para cubrir 0,5 veces sus necesidades de mantenimiento (0,5 M).

La dieta C consistió en 0,7 kg de pellets y 0,85 kg de paja de cebada por oveja y día, proporcionando 3,0 Mcal de EM y 12% de PB. La dieta B consistió en 0,25 kg de pellets y 0,30 kg de paja de cebada por oveja y día (1,0 Mcal de EM y 11,5% PB). La composición de los pellets fue cebada (65%), soja (30%) y suplemento mineral (5%).

A partir del día 7 (exp. 1) ó del día 15 (exp. 2) las ovejas se reagruparon y fueron sometidas a la dieta 1,5 M hasta los partos.

→Se utilizaron 8 machos enteros de la misma raza que se mantuvieron separados hasta el momento de la cubrición, 36 horas después de retirar las esponjas.

→Seis corderas en cada experimento, hijas de las ovejas pertenecientes a ambos grupos nutricionales (3 por grupo) se sacrificaron a los 2 meses de vida, se extrajeron sus ovarios y sus ovocitos fueron recuperados, madurados y fertilizados.

3. ACTIVIDADES

3.1. Sincronización del celo

Las ovejas fueron sincronizadas en celo mediante esponjas vaginales (Sincropart, CEVA Salud Animal, Barcelona), durante 14 días. A la retirada de las esponjas se administraron 300 UI de eCG.. Las cubriciones se iniciaron a partir de las 36 horas de la retirada de las esponjas. Visualmente se comprobó que todas las ovejas eran cubiertas al menos una vez..

Se tomaron los PV y CC de las ovejas en el momento de la colocación de las esponjas, a la retirada y a los 7 ó 15 días tras las cubriciones (exp 1 y 2, resp.).

3.2. - Diagnóstico de gestación

Aproximadamente 40 días tras la introducción de los machos, se realizaron ecografías transrectales con el fin de diagnosticar las gestaciones. Las hembras que se diagnosticaron como negativas fueron nuevamente ecografiadas 2 semanas después para evitar posibles falsos negativos.

El ecógrafo utilizado fue del tipo real-time B-mode scanner (Aloka SSD 500; Aloka Co., Tokyo, Japón), unido a una sonda transrectal de 7,5 MHz.

3.3. Parámetros reproductivos

Tras los partos se calcularon los porcentajes de fertilidad (número de ovejas paridas/número de ovejas del lote), la prolificidad (número de corderos/parto) y la fecundidad (número de corderos/oveja). También se calculó la duración de la gestación (días) y el ratio machos/hembras nacidos.

3.4. Pesaje de los corderos

En el momento de las pariciones se tomaron los pesos de los corderos nacidos y su sexo; desde este momento fueron registrados los pesos semanalmente hasta el momento del destete, con 40 días de edad. Se calcularon los crecimientos medios desde el nacimiento hasta el destete.

3.5. Producción *in vitro* de embriones

En ambos experimentos, a los 2 meses de edad, 6 corderas, hijas de ovejas pertenecientes a los dos grupos nutricionales (3 por grupo) fueron sacrificadas mediante un eutanásico (T-60, MSD) y sus ovarios extraídos con el fin de recoger sus ovocitos y fecundarlos *in vitro*.

3.5.1. Extracción de ovocitos

Los ovarios se transportan al laboratorio en una solución de PBS a 30-35° C en el menor tiempo posible para proceder a la extracción de los ovocitos. Los medios de maduración, fecundación y cultivo embrionario son medios que utilizan sistema tampón basado en el bicarbonato (PBS), y por tanto precisan un tiempo de estabilización de 4 horas en la estufa de CO₂ al 5%, que es donde tiene lugar la producción de los embriones.

Cuando se sacan de la estufa para evaluar su desarrollo o cambiarlos de medio los pocillos son cubiertos con aceite mineral para evitar variaciones de pH.

Antes de la ovulación, el ovocito inmaduro se encuentra en el interior de un folículo preovulatorio, rodeado de líquido folicular y células de la granulosa. Para extraer los ovocitos se debe romper este folículo y lo que se recupera es un ovocito inmaduro rodeado de un número variable de capas de células del *cumulus*. A este conjunto de ovocito y células del *cumulus* se le denomina complejo *cumulus*-ovocito (COC). Existen diferentes técnicas para su extracción, en este caso se ha realizado la técnica de *Slicing* que consiste en colocar los ovarios en una placa de Petri cubiertos parcialmente con el medio de manejo, se sujetan con unas pinzas y se raya toda la superficie del ovario con una hoja de bisturí. Una vez extraídos, los COCs se clasifican en función de su morfología, ya que no todos son aptos para su maduración. En la especie ovina se habla generalmente de tres tipos de COCs, descritos por Wani et al. (2000), según su morfología y presencia de células del *cumulus*:

1. **Buenos (*good*):** COCs con tres o más capas compactas de células del *cumulus* y citoplasma homogéneo.
2. **Normales (*fair*):** COCs con una o dos capas de células del *cumulus*, o varias capas incompletas y citoplasma homogéneo.
3. **Malos (*poor*):** ovocitos con pocas o ninguna célula del *cumulus*.

Se contabilizaron el número de ovocitos de cada clase encontrados.

3.5.2. Maduración

Los COCs de los grupos 1 y 2 se seleccionan para su maduración. Estos ovocitos se encuentran detenidos en la profase de la primera división meiótica, por lo que es necesario que se produzca la maduración nuclear y citoplasmática para que el ovocito alcance la competencia y pueda ser fecundado. Para ello se añade compuestos necesarios para que los procesos que se dan en el folículo dominante tengan lugar en la placa de cultivo:

- Medio base TMC-199: aporta nutrientes (sales, glucosa y otros azúcares, vitaminas y aminoácidos).

- Suero de oveja en celo (ESS): A un 10% de concentración, se añade para incrementar el rendimiento del proceso.
- Hormonas: FSH (5-10 μ g/ml) y LH (4-10 μ g/ml), indispensables para la correcta maduración.
- Otros: Cisteamina (100 μ M) un potente antioxidante que además promueve la maduración citoplasmática y mejora el posterior desarrollo embrionario incrementando el porcentaje de blastocitos obtenidos al final del cultivo. Piruvato sódico (0,3mM), los ovocitos lo utilizan como principal fuente de energía.

Estos compuestos añadidos al medio permiten la reanudación de la meiosis y la maduración citoplasmática. Tras la reanudación de la meiosis se produce la extrusión del primer corpúsculo polar entre 16 y 24 horas tras el comienzo de la maduración. La presencia de este corpúsculo polar es la señal de que el ovocito ha madurado y está listo para su fecundación.

De los COCs buenos y normales que se pusieron en el medio de maduración, se contabilizaron el número de ellos que llegan a madurar.

3.5.3. Fecundación

Los ovocitos que han alcanzado la metafase II ya están listos para la fecundación. Se simula la ovulación liberando los ovocitos maduros de las células del *cumulus* mediante un suave pipeteo y traspasándolos a un medio de fecundación similar al que se encuentra en los oviductos, donde se cocultivarán con los espermatozoides.

Estos espermatozoides hay que seleccionarlos y capacitarlos antes de introducirlos al medio. La selección de los espermatozoides tiene dos objetivos: por un lado, seleccionan los espermatozoides vivos, con su membrana intacta y una buena motilidad; por otro lado, los espermatozoides se separan del plasma seminal, ya que contiene proteínas que inhiben la capacitación y se resuspenden en un medio de cultivo rico en compuestos capacitantes.

Utilizamos el método de *swim-up* para la selección espermática que consiste en colocar el semen ovino en el fondo de un tubo y cubrirlo con un medio de cultivo de fecundación sin que se mezclen las fases. Tras una incubación de entre 25 minutos y 1 hora, los espermatozoides con buena motilidad progresiva habrán ascendido a la fase superior, lo que permite recoger una muestra con elevada calidad y motilidad para realizar la fecundación *in vitro*.

Una vez seleccionados los espermatozoides, la fecundación se realiza mediante la coincubación de los gametos en el medio de fecundación. Utilizamos el medio TCM-199 que además de nutrientes contiene una serie de iones como el bicarbonato, el calcio o el sodio que intervienen en los procesos de capacitación. Además, para facilitar el proceso a estos medios añadimos una serie de sustancias:

- Suero de oveja en celo (10%): Mantiene la viabilidad espermática y aumenta la salida de colesterol de las membranas, lo que favorece el inicio de la capacitación.
- Heparina (1,5-50 UI): Promueve la capacitación.
- Hipotaurina (10 μ M): Agente protector frente a la peroxidación.
- Lactato de calcio (2,9 mM): Indispensable para la capacitación.

Una vez que se ha producido la capacitación, los espermatozoides son capaces de unirse a la zona pelúcida del ovocito y posteriormente se produce la reacción acrosómica. Esta reacción permite al espermatozoide atravesar la zona pelúcida. Una vez que alcanza el espacio perivitelino del ovocito, se fusiona con la membrana plasmática de éste y se produce la fecundación. El conjunto de estos procesos se lleva a cabo durante un periodo de tiempo de varias horas.

Partiendo de los ovocitos que han madurado previamente, se contabilizaron el número de ellos que fueron fecundados.

3.5.4 Cultivo de embriones

Tras la fusión de ambos pronúcleos, el cigoto sufre una serie de divisiones mitóticas. La primera división ocurre a 22-36 horas tras la fecundación, da lugar a un embrión de 2 células. La siguiente división ocurre pocas horas después.

En este proceso se contabilizaron después de 48 horas de la fecundación los que llegaron a dividirse. Posteriormente, los que han llegado a blastocisto respecto a los embriones ya divididos y respecto a los ovocitos aptos para la maduración.

3.6. Análisis estadístico

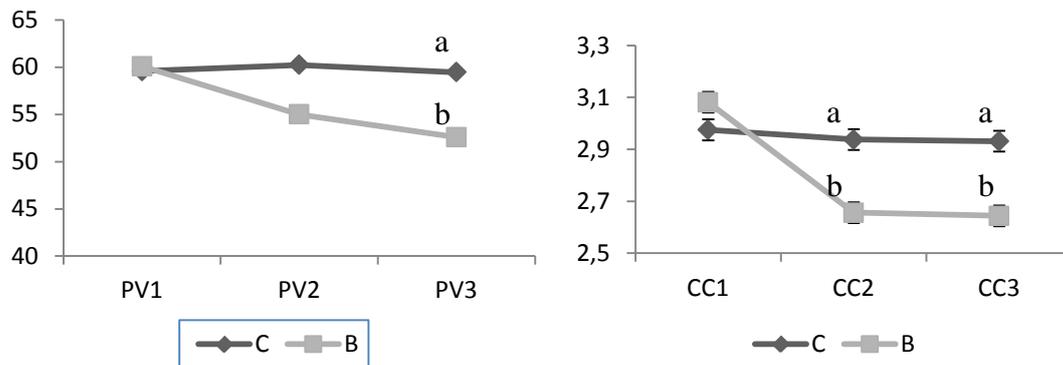
Se utilizó la prueba Chi cuadrado para la comparación de porcentajes y el ANOVA para las variables continuas.

VI. RESULTADOS

1.-Experimento 1:

Las ovejas del lote control mantuvieron su PV y CC a lo largo de la experiencia, mientras que las ovejas del lote bajo experimentaron una pérdida significativa ($p < 0,05$) tanto de PV como de CC (Fig. 1).

Figura 1. Evolución del PV y CC de ovejas alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 veces (B) el mantenimiento, desde la colocación de la esponja (PV1, CC1), en el momento del celo (PV2, CC2) y 7 días después de la aparición del celo (PV3, CC3). a, b: $p < 0,05$



La subnutrición periconcepcional hasta el día 7 de gestación dio lugar a unos resultados reproductivos inferiores al lote control (Tabla 1), con diferencias significativas ($p < 0,05$) para la prolificidad y fecundidad. La fertilidad tiende a ser menor en el grupo B pero no llega a ser una diferencia significativa.. La duración media de la gestación fue similar en ambos lotes, así como la tasa machos/hembras nacidos. El PV medio de los corderos nacidos de las ovejas del lote B fue significativamente ($p < 0,05$) superior que los corderos del lote C (Tabla 1), dándose una tendencia a la significación al comparar los corderos del mismo sexo. Por el contrario, no hubo diferencias en el PV al destete ni en el crecimiento medio diario hasta ese momento.

Tabla 1. Resultados reproductivos y productivos (media±E.S.) de ovejas alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 veces (B) las necesidades de mantenimiento 16 días antes de la cubrición y hasta 7 días después de la aparición del celo.

	C	B	Sig.
Fertilidad (% ovejas paridas)	77,5%	67,5%	NS
Prolificidad (corderos/parto)	2,06±0,16	1,59±0,12	p<0,05
Fecundidad (corderos/oveja)	1,60±0,18	1,07±0,14	p<0,05
Duración gestación (días)	148,9±0,4	149,2±0,4	NS
Relación machos/hembra	53/47	45/55	NS
Peso medio nacimiento (kg)	3,80±0,11	4,24±0,15	p<0,05
Peso machos nacimiento (kg)	3,90±0,16	4,35±0,22	p=0,10
Peso hembras nacimiento (kg)	3,69±0,14	4,15±0,20	p=0,06
Peso destete (kg)	13,29±0,38	13,61±0,50	NS
Peso destete machos (kg)	13,10±0,	13,03±0,	NS
Peso destete hembras (kg)	13,68±0,	13,72±0,	NS
Crecimiento hasta destete (g/d)	0,23±0,02	0,23±0,02	NS
Crecimiento hasta destete machos	0,22±0,04	0,21±0,08	NS
Crecimiento hasta destete hembras	0,24±0,02	0,23±0,05	NS

En cuanto a la población oocitaria, las corderas hijas del lote B presentaron un mayor número de ovocitos a los dos meses de vida (Tabla 2), aunque no hubo diferencias en cuanto a los porcentajes según su calidad.

Una vez madurados y fertilizados *in vitro*, los ovocitos procedentes de corderas hijas de madres subnutridas mostraron un mayor porcentaje de maduración (p<0,10) (Tabla 3), con resultados similares de fecundación, división a las 48 h y porcentaje de blastocistos.

Tabla 2. Número (media±E.S.) (%) y calidad de los ovocitos de corderas de 2 meses de edad, provenientes de madres que fueron alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 (B) veces las necesidades de mantenimiento 16 días antes de la cubrición y hasta 7 días después de la aparición del celo correspondiente a la gestación de las corderas.

Grupo	Buenos	Normales	Malos	Total	Para madurar (buenos+normales)
Control	19,0±5,9 ^a 31,7%	9,7±2,3 16,1%	31,3±10,58 ^c 52,2%	60,0±7,8 ^a	28,7 ± 3,8 ^a 47,8%
Bajo	49,3 ± 4,3 ^b 35,1%	16,3 ± 5,8 11,7%	74,3±14,3 ^d 53,2%	140,0±18, 5 ^b	65,7 ± 9,2 ^b 46,9%

a, b: p<0,05; c,d: p<0,1

Tabla 3. Resultados de maduración, FIV y cultivo de embriones procedentes de ovocitos de corderas hijas de madres alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 (B) veces el mantenimiento 16 días antes de la cubrición y hasta 7 días después de la aparición del celo correspondiente a la gestación de las corderas

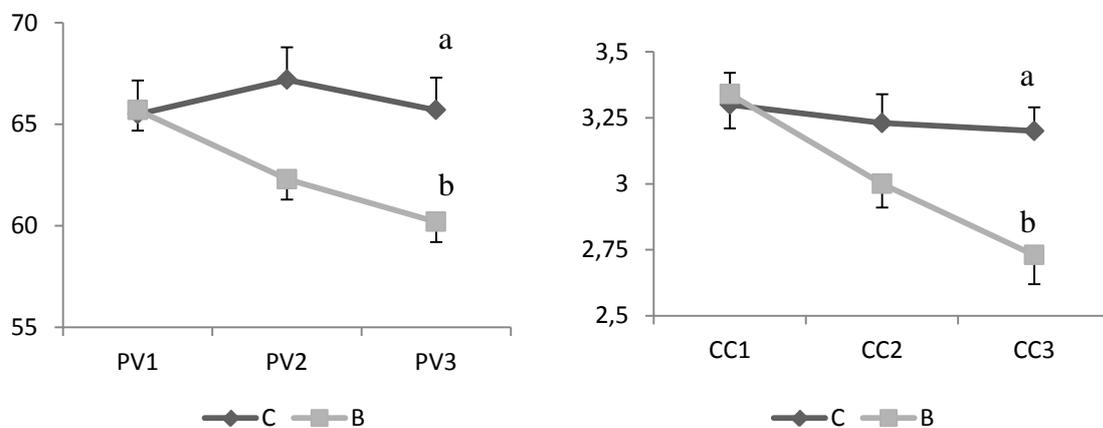
Grupo	Maduración	Fecundación	División 48 h	Blastocistos (sobre embriones)	Blastocistos (sobre ovocitos)
Alto	21/84 (25%) ^a	15/21 (71,4%)	13/84 (15,5%)	3/13 (23,1%)	3/84 (3,6%)
Bajo	70/197 (35,5%) ^b	60/70 (85,7%)	38/197 (19,3%)	3/38 (7,9%)	3/197 (1,5%)

a, b: p<0,1

2.- Experimento 2:

Las ovejas del lote B experimentaron una pérdida significativa ($p < 0,05$) tanto del PV como de la CC, mientras que el lote C mantuvo su PV y su CC a lo largo de toda la experiencia (Fig. 2).

**Figura 2. Evolución del PV y CC de ovejas alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 veces (B) el mantenimiento, desde la colocación de la esponja (PV1, CC1), en el momento del celo (PV2, CC2) y 15 días después de la aparición del celo (PV3, CC3).
a, b: $p < 0,05$**



La subnutrición periconcepcional hasta el día 15 dio lugar a unos resultados reproductivos inferiores al lote control aunque sin diferencias significativas. La fertilidad y fecundidad rozan la significación siendo menor el lote B, en cambio la prolificidad, la duración de la gestación y la relación machos/ hembras fueron similares (Tabla 4).

Respecto al peso medio de los corderos al nacimiento es superior en el lote B rozando la significación ($p = 0,10$), sobre todo comparando las hembras del lote B con las del C ($p=0,06$), en cambio no hubo diferencias en el peso de los machos. Tampoco hubo diferencias en el peso al destete ni en el crecimiento hasta destete (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados reproductivos y productivos (media±E.S.) de ovejas alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 veces (B) las necesidades de mantenimiento 16 días antes de la cubrición y hasta 15 días después de la aparición del celo.

	C	B	Sig.
Fertilidad (% ovejas paridas)	84,0%	64,0%	p=0,10
Prolificidad (corderos/parto)	1,84±0,12	1,79±0,15	NS
Fecundidad (corderos/oveja)	1,52±0,18	1,09±0,21	p=0,10
Duración gestación (días)	150,1±0,2	149,4±0,4	NS
Relación machos/hembra	13/19	9/16	NS
Peso medio nacimiento (kg)	4,10±0,13	4,40±0,14	p=0,10
Peso machos nacimiento (kg)	4,32±0,19	4,40±0,19	NS
Peso hembras nacimiento (kg)	3,95±0,17	4,41±0,15	p=0,06
Peso destete (kg)	14,06±0,28	14,50±0,55	NS
Peso destete machos (kg)	15,59±0,42	15,78±0,38	NS
Peso destete hembras (kg)	12,78±0,31	13,87±0,38	NS
Crecimiento hasta destete (g/d)	0,24±0,03	0,24±0,02	NS
Crecimiento hasta destete machos	0,28±0,01	0,26±0,03	NS
Crecimiento hasta destete hembras	0,22±0,05	0,24±0,10	NS

Respecto a la población oocitaria, las corderas hijas del lote B presentaron un mayor número de ovocitos a los dos meses de vida (Tabla 5) con diferencias significativas en los porcentajes de ovocitos para madurar (buenos + normales).

Una vez madurados y fertilizados *in vitro* los ovocitos procedentes de corderas hijas de madres control mostraron un mayor porcentaje de maduración ($p < 0,05$) y un mayor porcentaje a la división a las 48 horas, con resultados similares de fecundación y porcentaje de blastocistos (Tabla 6).

Tabla 5. Número (media±E.S.) (%) y calidad de los ovocitos de corderas de 2 meses de edad, provenientes de madres que fueron alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 (B) veces las necesidades de mantenimiento 16 días antes de la cubrición y hasta 15 días después de la aparición del celo correspondiente a la gestación de las corderas.

Grupo	Buenos	Normales	Malos	Total	Para madurar (buenos+normales)
Control	17,0±6,0 ^a 25,7%	4,3±2,0 ^c 6,5%	44,7±6,9 67,7%	66,0±14,7 ^c	21,3 ± 7,9 ^a 32,3% ^a
Bajo	53,0± 8,4 ^b 46,7%	15,0 ± 3,8 ^d 13,2%	45,7±4,3 40,2%	113,7±15,6 ^d	68,7 ± 12,1 ^b 60,4% ^b

a, b: p<0,05; c,d: p<0,1

Tabla 6. Resultados de maduración, FIV y cultivo de embriones procedentes de ovocitos de corderas hijas de madres alimentadas para cubrir 1,5 (C) o 0,5 (B) veces el mantenimiento 16 días antes de la cubrición y hasta 15 días después de la aparición del celo correspondiente a la gestación de las corderas.

Grupo	Maduración	Fecundación	División 48 h	Blastocistos (sobre embriones)	Blastocistos (sobre ovocitos)
Control	57/63 (90,5%) ^a	56/57 (98,2%)	55/63 (87,3%) ^a	3/55 (5,5%)	3/63 (4,8%)
Bajo	154/203 (75,9%) ^b	148/154 (96,1%)	136/203 (67,0%) ^b	18/136 (13,2%)	18/203 (8,8%)

a, b: p<0,05

VII. DISCUSIÓN

En este trabajo se han realizado dos experimentos: el experimento 1, sometiendo a las ovejas a una subnutrición 16 días antes de la cubrición hasta 7 días después de la aparición del celo, y el experimento 2, subnutrición 16 días antes de la cubrición hasta 15 días después de la aparición del celo. Ambos experimentos fueron llevados a cabo bajo la misma metodología, variando únicamente el periodo de subnutrición. Los resultados obtenidos del estudio de la población oocitaria de las corderas nacidas han sido, al menos, inesperados y de difícil discusión, al no haber mucha literatura sobre el tema. Del mismo modo, al menos sorprendentes son los superiores pesos al nacimiento mostrados por los corderos procedentes de ovejas subnutridas en el momento de la concepción de dichos corderos.

En ambos experimentos las ovejas control mantuvieron su PV y su CC a lo largo del experiencia, mientras que el lote bajo experimentó una pérdida significativa tanto del PV como de la CC.

En cuanto a los resultados reproductivos son inferiores en el lote B en ambos experimentos, especialmente en el experimento 1. En éste se observaron diferencias significativas en la prolificidad y fecundidad, y en el experimento 2 hubo una tendencia ($p= 0,10$) para la fertilidad y la fecundidad. Estos resultados son coincidentes con los descritos en la bibliografía y revisados por nuestro grupo (Abecia et al., 2006), y pueden deberse tanto a un efecto negativo de la subnutrición sobre la tasa de ovulación y la supervivencia embrionaria, dando lugar a un descenso en el número de ovejas paridas y en el número de corderos nacidos por parto.

Respecto a los parámetros productivos, en ambos experimentos se observó un aumento del peso medio al nacimiento de los corderos procedentes de ovejas subnutridas en el momento de la concepción, siendo significativo en el experimento 1, hecho que se inicialmente podría explicar debido a la mayor prolificidad del lote control. Es decir, al haber mayor número partos múltiples en el lote C, el peso medio podría ser menor que en el lote B, donde hay una mayor cantidad de partos sencillos, que habitualmente dan corderos al nacimiento con pesos superiores. Sin embargo este hecho no pudo ser

constatado. En el experimento 2 también se observó un peso medio al nacimiento superior, rozando la significación ($p=0,10$), y el peso de hembras ($p=0,16$) mientras que el de machos es muy similar, esto podría deberse a que hay mayor número de hembras aunque la relación machos/hembras no fue significativa. Estos resultados coinciden con los observados por Jaquier et al. (2012), que muestran un mayor PV al nacimiento especialmente en machos procedentes de ovejas subnutridas en el momento de la concepción explicándose por diferencias significativas en el porcentaje de grasa corporal encontrado en estos animales. En ambos experimentos no hubo diferencias en el peso al destete ni en el crecimiento medio diario hasta ese momento, hecho también coincidente con lo relatado por Jaquier et al. (2012).

En cuanto a la población oocitaria de las corderas hijas de ambos grupos también encontramos diferencias comparando los dos experimentos. En ambos experimentos las corderas hijas del lote B presentaron un mayor número de ovocitos a los dos meses de vida. Aunque en el experimento 1 no hubo diferencias en cuanto a los porcentajes de calidad, en el experimento 2 sí que las hubo, siendo mayores en el lote B. La dieta materna previa a la concepción puede afectar a la calidad del ovocito, como ha sido descrito previamente (Adamiak et al., 2005, Camboine et al., 2007, Hunter et al., 2005). Este efecto sobre los ovocitos afecta a la calidad del embrión y potencialmente al desarrollo del feto y la salud del adulto, lo que plantea la posibilidad de efectos en ovocitos en la próxima generación.

Se ha descrito que una restricción alimentaria de la oveja al principio y hasta mediada la gestación produce un descenso en la tasa de ovulación de la descendencia femenina (Rae et al., 2002). Este hecho puede iniciarse ya *in utero*, ya que se ha demostrado que una restricción al 50% de los nutrientes, como la que hemos realizado en nuestros experimentos, aumenta la proporción de lesiones oxidativas a nivel del DNA de las oogonias recuperadas de fetos de corderas a mitad de su gestación, en comparación con fetos gestados por ovejas alimentadas según necesidades (Murdoch et al., 2006).

Una vez madurados y fertilizados *in vitro* estos ovocitos, también se observaron diferencias entre experimentos: en el experimento 1 hubo un mayor porcentaje de ovocitos madurados en el grupo B, mientras que en el experimento 2 fue al contrario, dándose un mayor porcentaje de madurados en el grupo C, habiendo además un mayor porcentaje de ovocitos que llegan a la división a las 48 horas. Así, aumentar el periodo

de subnutrición incrementa el número de ovocitos para madurar en el grupo B pero en porcentaje maduran menos que en el grupo C.

VIII CONCLUSIONES

1. Un nivel de subnutrición del 50% alrededor de la concepción en la especie ovina tiene consecuencias negativas sobre el rendimiento reproductivo, viéndose afectados parámetros como la fertilidad, la prolificidad y la fecundidad.
2. Los corderos nacidos de ovejas subnutridas alrededor de la concepción presentan un mayor peso vivo al nacimiento, sin diferencias por sexos.
3. Las corderas nacidas de ovejas subnutridas alrededor de su concepción presentan una alteración en la cantidad de ovocitos recuperados, siendo su número superior en comparación con las corderas hijas de madres control.

IX BIBLIOGRAFÍA

- Abecia, J.A., Rhind, S.M., Bramley, T.A., McMillen, S.R., 1995. Steroid production and LH receptor concentrations of ovarian follicles and corpora lutea and associated rates of ova wastage in ewes given high and low levels of food intake before and after mating. *Anim. Sci.*
- Abecia, J.A., Rhind, S.M., Goddard, P.J., McMillen, S.R., Ahmadi, S., Elston, D.A. 1996. Jugular and ovarian venous profiles of progesterone and associated endometrial progesterone concentrations in pregnant and non-pregnant ewes. *Anim. Sci.* 63: 229- 234.
- Abecia, J.A., Lozano, J.M., Forcada, F., Zaragoza, L., 1997. Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day 8 of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 48, 209-218.
- Abecia, J.A., Lozano, J.M., Forcada, F. 1999. A preliminary study on the effects of dietary energy and melatonin on the ex vivo production of progesterone and prostaglandin F-2 alpha by the corpora lutea and endometrial tissue of ewes. *Vet. Res. Commun.* 23: 115-121.
- Abecia, J.A., Forcada, F., Lozano, J.M., 1999. A preliminary report on the effect of dietary energy on prostaglandin F-2 alpha production *in vitro*, interferon-tau synthesis by the conceptus, endometrial progesterone concentration on days 9 and 15 of pregnancy and associated rates of embryo wastage in ewes. *Theriogenology*, 52: 1203-1213.
- Abecia, J.A., Sosa, C., Forcada, F., Meikle, A., 2006. Review: The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* 46: 367-378.
- Abecia, A., Forcada, F. Manejo reproductivo en Ganado Ovino. 2010. Servet editorial.

- Adamiak, S. J., Mackie, K., Watt, R. G., Webb, R., and Sinclair, K. D., 2005. Impact of nutrition on oocyte quality: Cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol. Reprod.* 73, 918–926.
- Allison, A.J., 1977. Effect of nutritionally induced liveweight differences on ovulation rates and population of ovarian follicles in ewes. *Theriogenology*
- Boland, M.P., Lonergan, P., O’Callaghan, D., 2001. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology*, 55:1323-11340.
- Borwick, S.C., Rhind, S.M., McMillen, S.R., Racey, P.a., 1997. Effect of undernutrition of ewes from the time of mating on fetal development in mid gestation. *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 711-715.
- Boukhliq, R., Adams, N.R., Martin, G.B., 1996. Effect of nutrition on the balance of production of ovarian and pituitary hormones in ewes. *Anim. Repro. Sci.* 45: 59-70.
- Brien, F.D., Cumming, I.A., Clarke, I.J., Cocks, C.S. 1981. Role of plasma progesterone concentration in early-pregnancy of the ewe. *Aust. J. Agr.* 141:93.
- Cambonie, G., Comte, B., Zydorczyk, C., Ntimbane, T., Germain, N., Le[^], N. L., Pladys, P., Gauthier, C., Lahaie, I., Abran, D., Lavoie, J. C., and Nuyt, A. M., 2007. Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction, and microvascular rarefaction associated with in utero exposure to a low-protein diet. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R1236–R1245.
- Creed, J., McEvoy, T.G., Robinson, J.J., Aitken, R.P., Palmer, R.M., Robertson, I., 1994. The effect of preovulatory nutrition on the subsequent development of superovulated sheep ova in an *in vitro* culture system. *Anim. Prod.* 58:82.
- Einer-Jensen, N., McCracken, J.A., 1981. The transfer of progesterone in the ovarian vascular pedicle of the sheep. *Endocrinology*, 109: 685-690.

- Gallaher, B.W., Breier, B.H., Keven, C.L., Harding, J.E., Gluckman, P.D., 1998. Fetal programming of insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-binding protein-3: evidence for an altered response to undernutrition in late gestation following exposure to preconceptual undernutrition in the sheep. *J. Endocrinol.* 159, 501-508.
- Gunn, R.G., Sim, D., Hunter, E.A., 1995. Effects of nutrition in utero and in early life on the subsequent lifetime reproductive performance of Scottish Blackface ewes in two management systems. *Anim. Sci.* 60, 223-230.
- Hunter, R.H.F., 1987. *The fallopian tubes: their role in fertility and infertility.* Springer Verlag, London, p47.
- Hunter, M. G., Brankin, V., Quinn, R. L., Ferguson, E. M., Edwards, S. A., and Ashworth, C. J., 2005. Oocyte-somatic cell-endocrine interactions in pigs. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29, 371–384.
- Jaquierey, A.L., Oliver, M.H., Honeyfield-Ross, M., et al. 2012. Periconceptual undernutrition suppress cortisol response to arginine vasopressin and corticotropin-releasing hormone challenge in adult sheep offspring. *J. Nutr. Metab.* Article ID 123610.
- Kleeman, D.O., Walker, S.K., Seamark, R.F. 1994. Enhanced fetal growth in sheep administered progesterone during the first three days of pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 102: 411-417.
- Lozano, J.M., Abecia, J.A., Forcada, F., Zaragoza, L., Alfaro, B. 1998. Effect of undernutrition on progesterone in the uterus of ewes during the luteal phase of estrous cycle. *Theriogenology*, 49; 539-546.
- Lozano, J.M., Lonergan, P., Boland, M.P., O'Callaghan, D. 2003. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and postfertilization development. *Reproduction*, 125: 543-553.

- Lumey, L.H., 1992. Decreased birthweights in infants after maternal in utero exposure to the Dutch famine of 1944-1945. *Paediatr. Epidemiol.* 6, 240-253.
- Lummaa, V., Clutton-Brock, T., 2002. Early development, survival and reproduction in humans. *Trends Ecol. Evol.* 17, 141-147.
- McEvoy, T.G., Robinson, J.J., Aitken, R.P., Findlay, P.A., Palmer, R.M., Robertson, I.S. 1995. Dietary-induced suppression of preovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent in-vivo and in-vitro development of their ova. *Anim. Repro. Sci.*, 39:89-107.
- McMillen, C., Robinson, J.S., 2005. Development Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity, and Programming. *Physiol. Rev.* 85: 571-633.
- Mellanby, E., 1933. Nutrition and child bearing. *Lancet* ii, 1131-1137.
- Murdoch, W.J, Van Kirk, E.A, Vonnahme, K.A., Ford, S.P. 2003. Ovarian responses to undernutrition in pregnant ewes. *Reprod Biol Endocrinol*, 1:6.
- O'Callaghan, D., Yaakub, H. Hytel, P., Spicer, L.P., Boland, M.P. 2000. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentration in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 118: 303-313.
- Parr, R.A., Cumming, I.A. Clarke, I.J. 1982. Effect of maternal nutrition and plasma progesterone concentrations on survival and growth of the sheep embryo in early gestation. *J.Agric. Sci. Camb.* 98: 39-46.
- Parr, R.A., Davis, I.F., Fairclough, R.J., Miles, M.A. 1987. Overfeeding during early pregnancy reduces peripheral progesterone concentration and pregnancy rate in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 80:317- 320.
- Parr, R.A. 1992. Nutrition- progesterone interactions during early pregnancy in sheep. *Reprod. Fertile. Dev.* 4: 297-300.

- Pollard, I. 1986. Prenatal stress effects over two generations in rats. *J. Endocrinol.* 109, 239-244.
- Rae, M.T., Palassio, S., Kyle, C.E., Brooks, A.N., Lea, R.G., Miller, D.W., Rhind, S.M., 2001. Maternal undernutrition during pregnancy retards early ovarian development and subsequent follicular development in fetal sheep. *Reproduction* 122, 915-922.
- Rae, M.T., Rhind, S.M., Fowler, P.A., Miller, D.W., Brooks, A.N., 2002. Effect of maternal nutrition on fetal testicular steroidogenesis during the CNS androgen-responsive period in male sheep fetuses. *Reproduction* 124, 33-39.
- Rae, M.T., Kyle, C.E., Miller, D.W., Hammond, A.J., Brooks, A.N., 2002. The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 72, 63-71.
- Rhind, S.M., McNeilly, A.S. 1986. Follicle populations, ovulation rates and plasma profiles of lh, fsh and prolactin in Scottish blackface ewe in high and low-levels of body condition. *Anim. Reprod. Sci.* 10: 105-115.
- Rhind, S.M., McKelvey, W.A.C., McMillen, S.R., Gunn, R.G., Elston, D.A., 1989. Effect of restricted food intake, before and/or after mating, on the reproductive performance of greyface ewes. *Anim. Prod.* 48, 149-155.
- Rhind, S.M., McMillen, S., Wetherill, G.Z., McKelvey, W.A.C., Gunn, R.G. 1989. Effect of low-levels of food-intake before and/or after mating on gonadotropin and progesterone profiles in greyface ewes. *Anim. Prod.* 49: 267-273.
- Rhind, S.M., McNeilly, A.S. 1998. Effects of level of food intake on ovarian follicle number, size and steroidogenic capacity in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.* 52: 131-138.
- Rhind, S.M., Elston, D.A., Jones, J.R., McMillen, S.R., Gunn, R.G., 1998. Effects of restriction of growth and development of Brecon Cheviot ewe lambs on subsequent lifetime reproductive performance. *Small Ruminant Res.* 30, 121-126.

- Rhind, S.M., 2004. Effects of maternal nutrition on fetal and neonatal reproductive development and function. *Animal Reproduction Science* 82-83, 169-181.
- Rhind, S.M., Rea, M.T., Brooks, A.N., 2001. Effects of nutrition and environmental factors on the foetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* 122, 205-214.
- Rhind, S.M., Rae, M.T., Brooks, A.N., 2003. Environmental influences on the fetus and neonate – timing mechanisms of action and effects on subsequent adult function. *Domest. Anim. Endocrinol.* 25, 3-11.
- Russell, A.J.F., Doney, J.M. and Gunn, G. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal of Agricultural Science*, 72: 451-454.
- Viñoles, C., Forsberg, M., Martin, G.B., Cajarville, C., Repetto, J., Meikle, A. 2005. Shortterm nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction*, 129:299-309.
- Wallace, J.M., Aitken, R.P., Cheyne, M.A. 1994. Effects of post-ovulation nutritional-status in ewes on early conceptus survival and growth in-vivo and luteotrophic protein secretion in-vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 6: 253-259.
- Wani, N.A. 2000. Effect of oocyte harvesting techniques on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization in sheep. *Small Ruminant Research*, n°36, pp.63-67.
- Yaalub, H., O'Callaghan, D., Boland, M.P. 1997. *In vitro* embryo development from oocytes recovered from follicles in cattle in different diets. In: *Agric. Res. Forum*, 23rd Annual Research Meeting of Irish Grassland and Animal Production Association, p267-268.