

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EFFECTO DE LA OFERTA DE FORRAJE DE CAMPO NATURAL SOBRE
EL DESARROLLO FETAL DE CORDEROS CON ESPECIAL ÉNFASIS EN
EL DESARROLLO MUSCULAR**

por

María José ABUD CLARIGET

**TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magíster en Ciencias Agrarias opción
Ciencias Animales**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2015**

Tesis aprobada por el tribunal integrado por:
Ing. Agr. (PhD) Mariana Carriquiry
Lic. (PhD) Rodolfo Ungerfeld
Med. y Tec. Vet. (MSc.) Roberto Kremer

Autor: Ing. Agr. María José Abud Clariget.
Directora: Dra. M.V. (PhD) Raquel Pérez Clariget.
Co-director Dr. M.V. (PhD) Alejandro Bielli Pallela.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar dedico este trabajo a mi familia y amigas/os por su comprensión y apoyo incondicional durante esta etapa.

A mi tutora y amiga Dra. M.V. (PhD) Raquel Pérez por todo su apoyo y dedicación y las "charlas" y consejos sobre mi vida profesional y a mi cotutor, Dr. M.V. (PhD) Alejandro Bielli por su permanente apoyo y compromiso con este trabajo.

A los integrantes del tribunal de defensa de seminarios y de tesis, Ing. Agr. (PhD) Graciela Quintans, Ing. Agr. (PhD) Lucía Piaggio, Lic. (PhD) Rodolfo Ungerfeld, Ing. Agr. (PhD) María de Jesús Marichal, Ing. Agr. (PhD) Mariana Carriquiry y Med. y Tec. Vet. (MSc.) Roberto Kremer por las correcciones y los aportes brindados para la realización de este trabajo.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por otorgarme una beca de Maestría (POS_NAC_2012_1_9235).

A mis compañeros y amigos Andrea Álvarez, Aline Freitas de Melo, Alberto Casal, Álvaro López, Carlos López Mazz, Mariel Regueiro, Javier Ithurrealde, Patricia Genovese, Victoria Riaño y Mónica Viqueira por su apoyo y ayuda en la realización de trabajo de campo y análisis de laboratorio. Y al Ing. Agr. (PhD) Raúl Ponzoni por su ayuda y asesoría en los análisis estadísticos. A todos los estudiantes de grado de Facultad de Agronomía y Facultad de Veterinaria y a Sergio Ramírez, por su apoyo en las actividades de campo de esta tesis.

Y a la Estación Experimental "Bernardo Rosengurt" por el apoyo brindado durante la realización del trabajo de campo de esta tesis. Al Director de la Estación Ing. Agr. Carlos Mantero, a la jefatura de operaciones: Ings. Agrs. Eduardo Lena y Xenia Vieira, al Ing. Agr. David Silveira, al Tec. Pec. Ignacio Sosa y a los Srs Carlos García y Baltasar Martínez.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. PROGRAMACIÓN FETAL.....	2
1.1.1. <u>Efecto de la nutrición sobre el peso fetal, peso al nacimiento y</u> <u>dimensiones de las crías</u>	3
1.1.2. <u>Efecto de la nutrición sobre los órganos metabólicos, del sistema</u> <u>nervioso central, y reproductivos</u>	6
1.2. EFECTOS SOBRE EL DESARROLLO MUSCULAR.....	8
1.2.1. <u>Desarrollo muscular</u>	8
1.2.2. <u>Efectos nutricionales durante la vida intrauterina sobre el desarrollo</u> <u>muscular</u>	11
1.3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
1.3.1. <u>Hipótesis</u>	15
1.3.2. <u>Objetivo general</u>	15
1.3.3. <u>Objetivos específicos</u>	15
1.4. ESTRUCTURA GENERAL DE LA TESIS.....	16
2. <u>OFERTA DE FORRAJE DE CAMPO NATURAL EN OVEJAS GESTANTES:</u> <u>EFECTOS SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO – FETAL Y LA</u> <u>PRIORIZACIÓN EN LA PARTICIÓN DE NUTRIENTES EN FETOS Y</u> <u>CORDEROS</u>	17
2.1. RESUMEN.....	18
2.2. SUMMARY.....	19

2.3. INTRODUCCION.....	20
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.5. RESULTADOS.....	28
2.6. DISCUSIÓN.....	35
2.7. CONCLUSIONES.....	40
2.8. AGRADECIMIENTOS.....	40
2.9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
3. <u>EFFECT OF NATURAL GRASSLAND FORAGE ALLOWANCE OFFERED TO PREGNANT EWES ON THE MUSCLE DEVELOPMENT OF THE FETUSES AND NEWBORN LAMBS</u>	47
3.1. ABSTRACT.....	48
3.2. INTRODUCTION.....	49
3.3. MATHERIALS AND METHODS.....	50
3.4. RESULTS.....	55
3.5. DISCUSSION.....	60
3.6. CONCLUSIONS.....	64
3.7. ACKNOWLEDGMENTS.....	64
3.8. REFERENCES.....	64
4. <u>DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES GLOBALES</u>	70
4.1. DISCUSIÓN GENERAL.....	70
4.2. CONCLUSIONES GLOBALES.....	74
4.3. IMPLICANCIAS.....	74
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	76

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar el impacto de 1,4 a 2,6 kg (BOF) o 2,9-3,8 kg (AOF) de materia seca (MS) de campo natural/kg de peso vivo (PV) en ovejas gestantes, sobre indicadores del retardo del crecimiento intrauterino y la priorización de nutrientes (Trabajo 1; n=36) y el desarrollo muscular de *Longissimus lumborum* (LL) y *Semitendinosus* (ST) (Trabajo 2; n=36). Los resultados del trabajo 1, reflejan que el balance energético negativo más pronunciado sufrido por las madres del tratamiento BOF, indujo una partición de nutrientes diferencial más severa hacia los distintos órganos durante el desarrollo fetal. El feto de 70 días priorizó corazón, pulmón y riñones frente al desarrollo de los genitales externos. Los corderos neonatos del grupo BOF tuvieron menor peso al nacer y de la carcasa, tendieron a tener menor perímetro torácico y del miembro posterior y menor largo de éste. Además de un menor peso de los riñones, hígado, glándulas adrenales, testículos y tamaño de genitales externos que los del grupo AOF. Sin embargo, no se encontraron efectos del tratamiento nutricional sobre el peso del cerebro y cerebelo. La oferta de forraje modificó aspectos histológicos y moleculares de los músculos LL y ST (Trabajo 2). Tanto el músculo LL como el ST de fetos y corderos del grupo BOF tuvieron un menor diámetro de los fascículos musculares y fibras, número de núcleos/fascículo o fibra y proporción de tejido muscular que los del grupo AOF. La densidad fibrilar fue menor en el músculo LL y tendió a ser menor en el músculo ST, en los corderos de BOF. En los corderos de BOF también se observó una menor concentración de ADN y mayor relación proteína/ADN en ambos músculos, que en el grupo AOF. La concentración de proteína fue menor en los corderos de BOF en el músculo ST. La información generada en esta tesis permite concluir que una baja oferta de forraje (1,4-2,6 kg MS/kg PV), provocó una restricción nutricional durante el desarrollo embrionario – fetal con el consiguiente retardo del crecimiento intrauterino y una priorización de los nutrientes en el feto, en contra de órganos fundamentales para la producción animal, afectando el desarrollo de los músculos LL y ST, que podría comprometer el comportamiento productivo futuro de estos animales.

Palabras clave: corderos, programación fetal, músculos, subnutrición.

SUMMARY

EFFECT OF FORAGE ALLOWANCE OF NATURAL GRASSLAND ON THE FETAL DEVELOPMENT OF LAMBS WITH SPECIAL EMPHASIS ON MUSCLE DEVELOPMENT

The aim of this study was to compare the impact of 1.4 to 2.6 kg (LFA) or 2.9 -3.8 kg (HFA) of dry matter (DM) of natural grassland/kg live weight (LW) in pregnant sheep, on indicators of intrauterine growth retardation and prioritization of nutrients (Experiment 1; n= 36) and the muscle development of Longissimus lumborum (LL) and Semitendinosus (ST) (Experiment 2; n= 36). The results of the experiment 1, show that the negative energy balance more pronounced suffered by mothers of LFA treatment, induced a differential partition of nutrients more severe toward the various organs during fetal development. The fetus of 70 days prioritized heart, lung and kidneys against the development of the external genitalia. Newborn lambs from LFA group had lower birth weight and of the carcass, tended to have lower perimeter chest and of the hind limb and lower length of limb. In addition, they had a lower weight of the kidneys, liver, adrenal glands, testes and size of external genitalia than lambs from HFA group. However, no effects of nutritional treatments were found on the weight of the brain and cerebellum. The forage allowance modified histological and molecular aspects of LL and ST muscles (Experiment 2). Both, LL and ST muscle of fetuses and lambs from LFA had smaller diameter of the fascicle or fibers, number of nuclei/fascicle or fiber and proportion of muscle tissue than lambs from HFA. Fiber density was lower in LL muscle and tended to be lower in ST muscle in the lambs from LFA group. In lambs from LFA group was observed a lower DNA concentration and higher protein/DNA ratio in both muscles than in group HFA, and protein concentration was lower in lambs of LFA in ST muscle. The information generated in this thesis allows us to conclude that a low forage allowance (1.4 -2.6 kg DM/kg LW), caused a nutritional restriction during embryonic – fetal development with the consequent intrauterine growth retardation and a nutrients prioritization in the fetus, against animal production, affecting the development of LL and ST muscles, which could compromise the future productive behavior of these animals.

Key Words: lambs, fetal programming, muscles, subnutrition.

1. INTRODUCCIÓN

Uruguay re-direccionó parte de su producción ovina a la producción de corderos, después del desplome de los precios de la lana que se produjo al principio de la década del 90 (Bianchi y Garibotto, 2006). La carne ovina ocupa en la actualidad un lugar importante en la economía de Uruguay. Es el tercer país exportador de carne ovina, detrás de Australia y Nueva Zelanda y sus principales compradores son Brasil, China y la Unión Europea (DIEA, 2014). Anualmente se faenan casi 900 mil corderos y 120 mil borregos, se exportan aproximadamente 23 mil toneladas de peso canal e ingresan al país aproximadamente 92 millones de dólares por este concepto (DIEA, 2014). Por lo que, actualmente uno de los principales objetivos de la producción ovina es la producción de carne, es decir, la producción de músculo esquelético que constituye la carne roja de un mamífero.

La producción ovina en Uruguay se ha desarrollado tradicionalmente en condiciones extensivas, ocupando las zonas marginales de menor productividad de campo natural. Los índices reproductivos y productivos, en estas condiciones, son bajos y limitan la rentabilidad y la vocación agroexportadora del sector. La variación estacional en la producción y calidad de forraje, con un marcado descenso de la producción durante el invierno (Berretta *et al.*, 1994; Carámbula, 1991) son limitaciones en la utilización del campo natural en los sistemas de producción. Los efectos del cambio climático profundizan aún más la variabilidad característica de nuestro clima, por lo que es frecuente que sobre el patrón estacional de producción de forraje se sobreagreguen periodos de seca en cualquier época del año, lo que agrava la situación.

Las ovejas son una especie estacional de día corto (Hafez, 1952), por lo que la mayoría de las encarneradas en el país se llevan a cabo en otoño. Considerando que el largo de la gestación en esta especie es aproximadamente 148 ± 2 días (Jainudeen y Hafez, 1996), la crisis invernal del campo natural podría provocar periodos de subnutrición en las ovejas gestantes. La subnutrición durante la vida intrauterina puede provocar alteraciones en el feto y comprometer su futuro desarrollo y potencial productivo como animal adulto. En forma especial, podría afectarse el

crecimiento y desarrollo muscular de los corderos incidiendo en forma negativa en la producción de carne. El efecto de la subnutrición materna a consecuencia de la crisis invernal de las pasturas sobre el desarrollo muscular del feto y sus consecuencias futuras son, entonces, de particular interés para la cadena agro-industrial carne ovina.

1.1. PROGRAMACIÓN FETAL

Desde hace mucho tiempo el bajo peso al nacer que refleja un retardo del crecimiento intrauterino (RCIU) y sus consecuencias en el individuo adulto, es motivo de preocupación en humanos (Gluckman y Pinal, 2003; Belkacemi *et al.*, 2010). Barker (2003) planteó (hipótesis de Barker) que las condiciones intrauterinas que experimenta el feto pueden afectar la salud y el bienestar del adulto y ser transmitidas a su descendencia. Un bajo peso al nacer y lento crecimiento fetal están asociados a enfermedades coronarias y metabólicas en el adulto tales como una predisposición a la obesidad, a la diabetes y a presentar debilidad muscular (Calkins y Devaskar, 2011). El peso al nacimiento depende del crecimiento fetal durante la etapa intrauterina y de la capacidad de la unidad materno- placentaria de suministrar los nutrientes suficientes para cubrir las demandas del feto, necesarias para su crecimiento (Calkins y Devaskar, 2011).

En producción animal, el bajo peso al nacer podría influir en la mortalidad de las crías, a un deficiente crecimiento posnatal y a la alteración de la composición corporal y calidad de la carne además de a perjuicios a largo plazo en la salud de las crías (Greenwood y Bell, 2003; Wu *et al.*, 2004, 2006).

El término “programación fetal” describe las consecuencias permanentes generadas por efectos ambientales durante etapas claves del desarrollo fetal (Rhind *et al.*, 2001). La subnutrición de la madre puede afectar el desarrollo de órganos en forma permanente modificando aspectos tales como la cantidad de células del parénquima o la expresión de receptores hormonales claves para la fisiología del órgano en cuestión (Rhind *et al.*, 2001). Sin embargo, debido a que la diferenciación y maduración de los distintos órganos se produce en momentos diferentes de la vida embrionaria-fetal, el efecto de la subnutrición dependerá, entre otros factores, del momento de la gestación en que ésta suceda (Burton y Fowden, 2012).

1.1.1. Efecto de la nutrición sobre el peso fetal, peso al nacimiento y dimensiones de las crías

La nutrición de las ovejas durante la gestación influye el peso al nacimiento de las crías y su sobrevivencia. El peso al nacimiento se considera como la principal causa de mortalidad de corderos durante las primeras 72 horas de vida (Dwyer, 2008). En los Cuadros 1, 2 y 3 se presentan resultados publicados por distintos grupos de investigadores comparando diferentes tratamientos nutricionales aplicados a ovejas en diferentes etapas de la gestación sobre el peso fetal, peso al nacimiento y dimensiones corporales de los corderos.

Cuadro 1. Efecto de tratamientos nutricionales en ovejas gestantes sobre el peso de fetos entre 45 y 103 días.

Autores (Año) País	Tratamiento (número de fetos, n)	Días de gestación	Efectos
Clarke <i>et al.</i> (1998) Reino Unido	60% (5) vs 225% (5) Estabulado	30 - 80	No efecto
Osgerby <i>et al.</i> (2002) Reino Unido	70% (5) vs 100% (4) 70% (4) vs 100% (5) Estabulado	22 - 45 22 - 90	No efecto
Vonnahme <i>et al.</i> (2003) EE.UU	50% (7) vs 100% (6) Estabulado	28 - 78	Reducción: 32%
Zhu <i>et al.</i> (2004) EE.UU	50% (5) vs 100% (5) Estabulado	28 - 78	Reducción: aprox. 20%
Blair <i>et al.</i> (2010) Nueva Zelanda	100% (14) vs 150% (13) Pastoreo	19 - 103	No efecto
Blair <i>et al.</i> (2011) Nueva Zelanda	100% (10) vs <i>ad libitum</i> (19) 100% (10) vs <i>ad libitum</i> (10) Pastoreo	21 - 65 21 - 100	No efecto

Cuadro 2. Efecto de tratamientos nutricionales en ovejas gestantes sobre el peso de fetos mayores a 135 días o corderos neonatos.

Autor (Año)	Tratamientos nutricionales (número de corderos, n)	Días de gestación	Efectos
Bielli <i>et al.</i> (2002) Australia/Uruguay	70% (13) vs 110% (12) Estabulado	70 a 145	Reducción: 12%
Osgerby <i>et al.</i> (2002) Reino Unido	70% (4) vs 100% (5) Estabulado	22 a 135	Reducción: 12%
Rae <i>et al.</i> (2002) Reino Unido	50% (18) vs 100% (14) Estabulado	1 a 95	No efecto
Blair <i>et al.</i> (2010) Nueva Zelanda	100% (12) vs 150% (12) Pastoreo	19 a 136	No efecto
Smith <i>et al.</i> (2010) Irlanda	70% (35) vs 110% (31) Estabulado	-28 a 7	No efecto
Blair <i>et al.</i> (2011) Nueva Zelanda	100% (10) vs <i>ad libitum</i> (10) Pastoreo	21 a 140	No efecto
Kenyon <i>et al.</i> (2011a) Nueva Zelanda	100% (20) vs <i>ad libitum</i> (19) Pastoreo	21 a 140	Reducción: 8% en ovejas livianas
Cal-Pereyra <i>et al.</i> (2011) Uruguay	Pradera (13) vs Pradera + suplementación (12)	90 a 140	Reducción: 14% a 24 h de nacidos
Debus <i>et al.</i> (2012) Francia	50% (26) vs 100% (26) Estabulado	-15 a 30	No efecto
Ferreira <i>et al.</i> (2014) Uruguay	70% (21) vs 100% (20) Estabulado	45 a 115	No efecto

Cuadro 3. Efecto de tratamientos nutricionales en ovejas gestantes sobre largo cráneo caudal (LCC) perímetro torácico (PT) y longitud del miembro posterior (MP) de fetos mayores a 135 días y corderos neonatos.

Autor (Año)	Tratamientos nutricionales (número de corderos, n)	Días de gestación	Efectos
Osgerby <i>et al.</i> (2002) Reino Unido	70% (13) vs 100% (14) Estabulado	22 -135	Reducción: 10% PT
Kenyon <i>et al.</i> (2009) Nueva Zelanda	100% (83) vs <i>ad libitum</i> (78) Pastoreo	21 - 140	Reducción: 3% LCC, PT y MP
Blair <i>et al.</i> (2010) Nueva Zelanda	100% (12) vs 150% (12) Pastoreo	19 - 136	No efecto
Blair <i>et al.</i> (2011) Nueva Zelanda	100% (10) vs <i>ad libitum</i> (10) Pastoreo	21 - 140	Reducción: 4% LCC 3% de PT
Jaquierey <i>et al.</i> (2012) Nueva Zelanda	100% (5) vs pérdida PV (11) 100% (5) vs pérdida PV (10) 100% (5) vs pérdida PV (12)	-61 a 0 -61 a 30 -2 a 30	Reducción: 6-12% LCC 7% MP

A partir de los antecedentes reportados en el Cuadro 1, parecería que el efecto de la nutrición de las ovejas durante la gestación sobre el peso fetal estaría en función de la intensidad de la restricción nutricional. Como lo publicara recientemente, Kenyon y Blair (2014) en una revisión sobre los efectos de la nutrición y el tamaño de las ovejas gestantes sobre el peso al nacer de la descendencia, la nutrición de la oveja gestante durante el primer y segundo tercio de la gestación no afectaría el peso de la cría al nacer (Cuadro 2). Restricciones nutricionales durante la gestación temprana o media pueden compensarse con una adecuada alimentación durante el último tercio de la gestación, si ésta no fue severa. Mientras que, períodos prolongados de subnutrición o una restricción en el último tercio, momento de máximo crecimiento fetal, afecta el peso al nacimiento (Kenyon y Blair, 2014). Parece más importante el momento en que la restricción se aplica que la magnitud de

la misma (Cuadro 2). Por otra parte, un aumento del plano nutricional durante la gestación parece no ser efectiva para aumentar el peso fetal y al nacer, al menos de los fetos y corderos únicos, excepto en ovejas livianas (Cuadro 2).

Por otra parte, restricciones nutricionales durante la gestación resultan en crías con dimensiones corporales de proporciones alteradas, que son indicadores de RCIU (Mitchell, 2001; Gluckman y Pinal, 2003; Wu *et al.*, 2004, 2006). Del Cuadro 3 se desprende que la nutrición de las ovejas durante la gestación tendría un efecto diferencial sobre las dimensiones corporales de las crías. Sin embargo, Blair *et al.* (2010) no encontraron efectos de la nutrición sobre el perímetro torácico y el largo cráneo caudal, parecería que en este estudio las ovejas del grupo de mantenimiento no sufrieron restricciones nutricionales durante la gestación que pudiese afectar las dimensiones corporales de sus crías.

1.1.2. Efecto de la nutrición sobre los órganos metabólicos, del sistema nervioso central y reproductivos

La nutrición de la oveja gestante influye en el peso de los órganos fetales. Una restricción del 70% de los requerimientos energéticos en ovejas desde el día 22 de la gestación, reduce el peso del corazón, páncreas, timo y músculo semitendinoso (ST) y del tamaño del húmero y escápula en fetos de 135 días (Osgerby *et al.*, 2002). Así como el peso del hígado y de los riñones (Osgerby *et al.*, 2002; Vonnahme *et al.*, 2003). Sin embargo, cuando se analizan los cocientes de los pesos de estos órganos sobre el peso fetal, las diferencias desaparecen, sugiriendo que el efecto del tratamiento actúa fundamentalmente sobre el peso corporal total, sin que se evidencie una diferencia en la priorización de los nutrientes entre los órganos fetales. El peso del cerebro parece no estar influido por la nutrición de la madre (Osgerby *et al.*, 2002; Jaquier *et al.*, 2012) sugiriendo que los órganos del sistema nervioso central son priorizados para su desarrollo durante la etapa fetal. La hipótesis de Nathanielsz y Hanson (2003) plantea que frente a una restricción nutricional, el embrión - feto priorizará aquellos órganos que percibe como vitales para su desarrollo, en este esquema prioriza el cerebro pero sacrifica el hígado (“spare the brain, spoil the liver”). Estudios recientes en corderos aportan sustento a esta hipótesis. Gao *et al.*

(2014) estudiaron en fetos ovinos, el efecto de la subnutrición materna desde 90 días hasta 140 días de gestación sobre el hígado y reportaron que la reducción en el peso del órgano (15 y 28%) de las crías disminuyó en función del nivel de restricción nutricional de sus madres. Además, y agravando la situación, observaron la presencia de fibrosis hepática y una disminución de actividades enzimáticas vinculadas a la funcionalidad hepática en los fetos de las madres subnutridas. Nuestro equipo trabajando con investigadores australianos en condiciones estabuladas observó que los corderos cuyas madres habían sido alimentadas con 70% de los requerimientos de energía metabolizable desde la 10ma semana de gestación hasta el parto, tuvieron hígados 27% más livianos que aquellos corderos provenientes de madres alimentadas con 110% (Pérez-Clariget *et al.*, 2003).

Un aumento del plano nutricional de la oveja gestante, también influye en el peso de los órganos fetales. El equipo neozelandés, dirigido por Kenyon, sometió a ovejas preñadas durante la gestación a 2 planos nutricionales en condiciones de pastoreo (mantenimiento vs ad libitum) y reportó aumentos de peso de distintos órganos. Estos autores utilizaron 2 modelos estadísticos, por un lado compararon los pesos absolutos de los órganos fetales y en un segundo modelo incluyeron el peso de cordero como covariable. Reportaron en ovejas gestantes de mellizos (Blair *et al.*, 2011) menores pesos de corazón, glándulas adrenales, glándulas tiroides, timo y músculo ST en los corderos del grupo de Mantenimiento. En los corderos de gestación simple observaron menores pesos del timo y glándulas tiroides (Kenyon *et al.*, 2011b). Sin embargo, cuando ajustaron el modelo incluyendo como covariable el peso de las crías, las diferencias en peso de corazón, glándulas adrenales, timo y músculo ST desaparecieron. Por otro lado, el peso de hígado y riñones no fue diferente cuando no fue ajustado por peso fetal, en cambio cuando se hizo el ajuste en el modelo (peso fetal como covariable), el hígado y los riñones fueron más pesados en los fetos cuyas madres recibieron una dieta de mantenimiento.

La influencia de la nutrición de la oveja sobre el desarrollo de los órganos reproductivos ha sido revisada por Gunn *et al.* (1995); Rhind *et al.* (2001); Rhind (2004); Lea *et al.* (2006) y Zambrano *et al.* (2014). Existen evidencias que la subnutrición materna afectaría más a los órganos reproductivos de la hembra que del

macho (Rae *et al.*, 2002). Bielli *et al.* (2002), trabajando con ovejas estabuladas sometidas a 70 o 110% de los requerimientos energéticos desde la 10ma semana hasta el parto, no observaron diferencias en el peso de los testículos coincidiendo con los resultados reportados por Osgerby *et al.* (2002). Sin embargo el grupo de Bielli, encontraron una disminución del número de células de Sertoli por corte de sección de los cordones y por testículo en el grupo 70% El número de células de Sertoli está altamente correlacionada con el tamaño testicular en el adulto y con la producción espermática máxima.

1.2. EFECTOS DE LA NUTRICIÓN SOBRE EL DESARROLLO MUSCULAR

1.2.1. Desarrollo muscular

El músculo esquelético se forman a partir de somites mesodérmicos a lo largo del eje embrionario en la 2da o 3era semana de vida (Lawrie, 1998) en un proceso conocido como miogénesis (Rehfeldt *et al.*, 2004; Figura 1). Los mioblastos se dividen por mitosis y luego se fusionan para constituir la fibra muscular. Durante este proceso se produce una primera formación de fibras musculares, caracterizadas por poseer las miofibrillas localizadas en la periferia que rodean a un eje central de núcleos y citoplasma (Beermann *et al.*, 1978). Estas son conocidas como las fibras primarias y se forman durante las etapas iniciales de la fusión de mioblastos, en la denominada primera ola de diferenciación. Posteriormente, se forman fibras musculares secundarias derivadas de las células precursoras de los músculos, las cuales son inicialmente mantenidas en estadio proliferativo e indiferenciado, para luego diferenciarse en mioblastos (Swatland, 1973). Estas fibras secundarias son las que dan origen a la mayoría de las fibras musculares esqueléticas (Beermann *et al.*, 1978) y se originan a partir de la segunda ola de proliferación y diferenciación de mioblastos. Su formación se solapa parcialmente con la formación de adipocitos (adipogénesis) y fibroblastos (fibrogénesis) intramusculares (Du *et al.*, 2010).

El músculo es un órgano constituido por diferentes tipos de células, las fibras musculares, los adipocitos, las células del tejido conectivo, endoteliales y del tejido nervioso. Las células del tejido muscular, también conocidas como fibras musculares, son la unidad básica morfofuncional del músculo, que le confiere al

órgano las propiedades de excitabilidad y contractilidad y constituyen aproximadamente el 80-90% del volumen del órgano (Lawrie, 1998). Se extienden a lo largo del músculo desde un tendón a otro, y en los ovinos tienen un diámetro de entre 25 y 50 μm (Rehfeldt *et al.*, 2004). La masa muscular está determinada por el número de fibras musculares y por el tamaño de las mismas (Houba y Te Pas, 2004).

En la mayoría de los músculos que se han estudiado, el número de fibras musculares alcanza su valor máximo alrededor del nacimiento, permaneciendo incambiado durante la vida posnatal (Lawrie, 1998). Es así, entonces, que el máximo potencial de producción de carne quedaría determinado en ese momento. El crecimiento posnatal de los músculos está basado en el alargamiento y en el aumento del diámetro de la fibra muscular sin que aumente su número, es decir, el músculo crece posteriormente al nacimiento por hipertrofia (Johnston *et al.*, 1975). El crecimiento muscular intrauterino se debe principalmente a dos procesos: la proliferación celular (hiperplasia) y al aumento del diámetro y longitud de las fibras musculares debido a la síntesis de proteínas (hipertrofia). El número de núcleos de las fibras musculares determina la capacidad de síntesis de proteínas. En resumen, el proceso de hipertrofia muscular se produce tanto en la vida intra y extra uterina, mientras que el proceso de hiperplasia es exclusivo de la intrauterina.

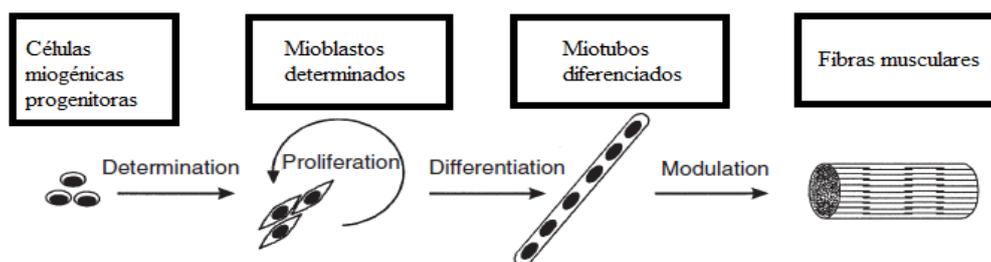


Figura 1. Proceso de miogénesis (adaptado de Rehfeldt *et al.*, 2004).

Los mioblastos son células capaces de sintetizar ADN y dividirse. La fusión de estos mioblastos mononucleados lleva a la formación de células multinucleadas (miotúbulos), cuyos núcleos son incapaces de sintetizar ADN y por lo tanto pierden la capacidad de dividirse por mitosis (Allen *et al.*, 1979). Es así, entonces, que en la mayoría de los mamíferos, el número de fibras del músculo esquelético se determina

antes de nacer, así como el número de núcleos de sus fibras. Sin embargo, existe otra población de mioblastos que se denominan células satélites, las cuales no forman fibras pero rodean las miofibras. Las células satélite son responsables del crecimiento, mantenimiento y la regeneración del músculo esquelético, sin embargo todavía se desconoce si son células madres o mioblastos indiferenciados (Kuang *et al.*, 2007). Estas células normalmente están mitóticamente quiescentes pero se activan en respuesta al estrés por un trauma por lesiones. Son capaces de sintetizar ADN y dividirse durante la hipertrofia posnatal para luego fusionarse con las fibras musculares existentes, hecho crucial para el crecimiento muscular postnatal (Kuang *et al.*, 2007). Estas células satélites podrían incorporar nuevos núcleos a las fibras musculares en la etapa posnatal. Sin embargo, la información disponible sobre la posible compensación que las células satélites ejercerían sobre el músculo esquelético con menor número de núcleos en las fibras musculares debido a la subnutrición en la etapa intrauterina se desconoce.

La hipertrofia de la fibra muscular en la etapa posnatal, depende en gran medida del número total de fibras musculares dentro de un músculo. La tasa de crecimiento posnatal de la fibra muscular individual suele ser inferior cuando existe un número alto de fibras y superior cuando existen un número bajo de fibras musculares. Es decir, el tamaño de las fibras musculares esta correlacionado inversamente con el número de fibras musculares (Rehfeldt *et al.*, 1999). Una explicación de este antagonismo entre el número de fibras musculares y su tamaño, sería debido a la distribución de los nutrientes dentro del músculo, aunque existen evidencias que algunos animales presentarían un alto grado de hipertrofia y un alto número de fibras musculares (Rehfeldt *et al.*, 1999).

Considerando que el proceso de desarrollo muscular se puede separar en 3 etapas: embrionaria, fetal y posnatal, que corresponden a la miogénesis primaria, miogénesis secundaria y crecimiento posnatal, respectivamente (Du *et al.*, 2010) y que los procesos de hiperplasia muscular en el feto ovino terminan alrededor del día 85 (Fahey *et al.*, 2005a) al 105 (Maier *et al.*, 1992) se modificó el esquema presentado por Du *et al.* (2010) para la especie bovina. Para ello se consideró como

fin de la etapa proliferativa el día 100 de la gestación. El esquema se presenta en la Figura 2.

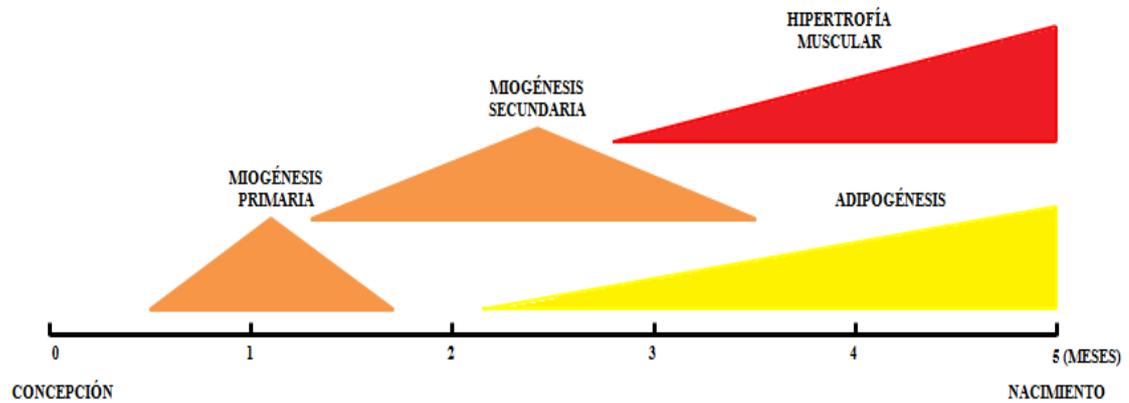


Figura 2. Efectos de la nutrición fetal en el desarrollo muscular y adipogénesis en ovinos (Adaptado de Du *et al.*, 2010).

1.2.2. Efectos nutricionales durante la vida intrauterina sobre el desarrollo muscular

El desarrollo primario de la fibra muscular depende fundamentalmente del genotipo del animal (Houba y te Pas, 2004). En cambio, el desarrollo secundario es influenciado por factores ambientales, tales como la nutrición (Dwyer *et al.*, 1994; Rehfeldt *et al.*, 1999). El RCIU está asociado a alteraciones en la composición muscular y corporal, así como a la distribución del tipo de fibras musculares (Wu *et al.*, 2006). Recientemente Du *et al.* (2015) han publicado una revisión sobre la programación fetal de la carne, que no solo atiende a la fibra muscular sino a las otras líneas celulares que posee el músculo y a la relación de competencia que presentan éstas líneas.

El efecto de la restricción nutricional de la madre sobre el desarrollo muscular depende de la etapa de la gestación en que la subnutrición se produce (Du *et al.*, 2010; Fig 2). Restricciones previas a los 85 días de gestación afectarían la etapa proliferativa del proceso de miogénesis dando como resultado un menor número de fibras en el músculo, mientras que restricciones posteriores al día 85 de gestación reducirían el tamaño de la fibra (Fahey *et al.*, 2005b). La miogénesis secundaria, cuando la mayor parte de las fibras musculares se forman, es un proceso susceptible

a interferencias (Du *et al.*, 2010). La prioridad en la partición de nutrientes para el músculo durante el desarrollo fetal parece ser baja comparado con otros órganos, por lo que se podría decir que el desarrollo muscular presenta una mayor vulnerabilidad frente a la restricción nutricional durante la etapa fetal (Zhu *et al.*, 2006). La subnutrición durante el primer y segundo tercio de la gestación puede no influir el peso al nacimiento de los corderos (Kenyon y Blair, 2014), pero influirían negativamente en la miogénesis secundaria (Cuadro 4).

Un grupo de investigadores de EEUU (Greenwood *et al.*, 2000) evaluaron los efectos del peso al nacimiento y de la dieta posnatal sobre el crecimiento y desarrollo de 8 músculos esqueléticos, incluyendo el ST. Estos autores concluyeron que el peso al nacimiento tuvo un pequeño pero significativo efecto en el peso del músculo durante el crecimiento posnatal, y que este efecto estaba mediado por la cantidad de ADN muscular y no por el número de miofibras. Estos hallazgos sugerirían que el número de núcleos sería más importante que el número de miofibrillas en el crecimiento y desarrollo muscular posnatal. También observaron que no todos los músculos son afectados de la misma manera por la variación en la nutrición pre y posnatal.

Cuadro 4. Efecto de tratamientos nutricionales en ovejas gestantes sobre el desarrollo muscular de los corderos machos.

Autor (Año)	Tratamientos nutricionales (número de corderos, n)	Días de gestación	Efectos
Zhu <i>et al.</i> (2004) EE.UU	50% (5) vs 100% (5) Estabulado	28 a 78	< número de miofibras secundarias
Fahey <i>et al.</i> (2005b) Reino Unido	50% (8) vs 100% (8) 50% (8) vs 100% (8) 50% (8) vs 100% (8) Estabulado	30 a 70 55 a 95 85 a 115	< número de fibras rápidas y > de fibras lentas > diámetro de fibras rápidas en músculos LM y VL No se encontraron efectos. Sin efecto en no. fibras, si en peso muscular de VL y LM.
Zhu <i>et al.</i> (2006) EE.UU	50% (7) vs 100% (6) Estabulado	28 - 78	> diámetro de miofibras, < no. de miofibras y > triglicéridos intramusculares en <i>Longissimus dorsi</i> .
Daniel <i>et al.</i> (2007) Reino Unido	50% (15) vs 100% (12) Estabulado	30 - 70 30 - 85	> no. de fibras rápidas en músculo LM > no de fibras rápidas, en músculos LM y ST y > contenido de grasa intramuscular.
Costello <i>et al.</i> (2008) Reino Unido	40% (8) vs 100% (9) Estabulado	1 - 31 104 - 127	< densidad de miofibras y capilares en músculo <i>Triceps brachii</i> . Sin efectos en <i>Soleus</i> .
Muñoz <i>et al.</i> (2009) Reino Unido	60% (32) vs 100% (27) vs 200% (24)	1 - 39	< conformación carcasa > contenido de grasa subcutánea

Otro grupo de investigadores en Brasil (Santello *et al.*, 2010), estudiaron el efecto de la proteína en la dieta de ovejas gestantes en el primer tercio de gestación y no observaron efectos sobre el peso al nacimiento, ni a los 30 días, ni al destete de las crías, como tampoco sobre el número y diámetro de fibras musculares del músculo ST al nacimiento. Parecería que aumentar el aporte proteico por encima de los requerimientos, no tendría efectos sobre el desarrollo muscular.

La subnutrición intrauterina puede provocar cambios en la composición del músculo. En efecto, el contenido de triglicéridos en el músculo esquelético y el contenido de grasa visceral son mayores en corderos nacidos de madres que sufrieron restricción nutricional durante la gestación (Fahey *et al.*, 2005b). Los distintos procesos que se llevan a cabo en el músculo fetal (miogénesis, adipogénesis y fibrogénesis) compiten por los nutrientes, ya que todas las células derivan del mesodermo (Du *et al.*, 2015). Además, como las células adipogénicas y fibrogénicas comparten las mismas células progenitoras, existe la oportunidad de manipular la diferenciación de esas células a favor de los adipocitos y así incrementar la grasa intramuscular, mejorando el sabor de la carne (Du *et al.*, 2015). Existen trabajos nacionales en vacas de carne (García Pintos y Pereyra, 2012; Machado y Muzzio, 2013) que evaluaron una suplementación durante el último mes de gestación o el efecto de 2 ofertas de forraje, sobre el proceso de adipogénesis en el músculo. En ambos trabajos se encontró un efecto positivo sobre la expresión del transcripto *PPAR-γ* que estimula la expresión de genes vinculados a la acumulación de grasa en las células. Por lo que el mejor nivel nutricional durante la última etapa de la gestación estimularía la adipogénesis muscular y por lo tanto mejoraría la calidad de la carne. En resumen, la nutrición de la madre puede tener impactos sobre la cantidad y calidad del músculo esquelético de la cría al nacer potenciando o limitando el comportamiento productivo futuro de los animales.

Los ovinos en la región se producen en sistemas pastoriles basados en la utilización del campo natural. La oferta de forraje es una herramienta de gran impacto tanto sobre la pasturas como en el animal y toma en cuenta la relación entre los kg de materia seca en una determinada área y el número de animales, en un determinado periodo de tiempo. O sea vincula la carga animal con la producción de

pasturas. En Uruguay y en la región la oferta de forraje se expresa como kg de materia seca cada 100 kg de peso vivo por día (Jochims *et al.*, 2013). Sollenberger *et al.* (2005) consideran que esta forma de expresar la oferta de forraje dificulta la comparación entre trabajos y proponen expresarlo como kg de materia seca/kg de peso vivo, y no por unidad de tiempo.

La información sobre el efecto de la oferta de forraje sobre el desarrollo embrionario – fetal y en especial sobre el desarrollo muscular en ovinos es escasa a pesar del impacto productivo que podría tener. Tampoco abunda la información sobre la priorización de nutrientes que hace el feto en condiciones de subnutrición intrauterina.

1.3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.3.1. Hipótesis

1) Una oferta de forraje de 1,4-2,6 kg de materia seca (MS)/kg de peso vivo (PV) de campo natural en ovejas gestantes induce una subnutrición que provoca un retardo en el crecimiento intrauterino (RCIU) y una diferente priorización en la partición de nutrientes en la vida fetal en el feto de 70 días y corderos neonatos.

2) Una oferta de forraje de 1,4 a 2,6 kg MS/kg PV de campo natural desde 23 días antes de la concepción hasta el día 70 o 122 de gestación afectan el crecimiento y desarrollo de los músculos *Longissimus lumborum* y *Semitendinosus* de fetos ovinos de 70 días y corderos neonatos.

1.3.2. Objetivo general

Aportar información sobre el posible impacto de la oferta de forraje de campo natural en las majadas de cría sobre los indicadores productivos y el desarrollo fetal de las crías y su posible impacto en la producción de carne.

1.3.3. Objetivos específicos:

1) Evaluar el efecto de dos ofertas de forraje de campo natural (1,4 a 2,6 kg MS/kg PV vs 2,9-3,8 kg MS/kg PV) de ovejas gestantes sobre el desarrollo embrionario –fetal y la priorización en la partición de nutrientes a través de

indicadores de RCIU (el peso y dimensiones corporales, peso de la carcasa y de los principales órganos, y dimensiones de los genitales externos) en fetos de 70 días y corderos neonatos.

2) Evaluar el efecto de dos ofertas de forraje de campo natural (1,4 a 2,6 kg MS/kg PV vs 2,9-3,8 kg MS/kg PV) desde 23 días antes de la concepción hasta el día 70 o 122 de gestación sobre el crecimiento y desarrollo de los músculos *Longissimus lumborum* y *Semitendinosus* (densidad y diámetro de los fascículos o fibras musculares, números de núcleos/fascículo o fibra muscular, volumen porcentual de tejido muscular y no muscular y concentración de ADN, ARN y proteína de la fibra muscular) en fetos de 70 días y corderos neonatos.

1.4. ESTRUCTURA GENERAL DE LA TESIS

Consiste en dos artículos científicos, el primero titulado “*Oferta de forraje de campo natural en ovejas gestantes: Efectos sobre el desarrollo embrionario – fetal y la priorización en la partición de nutrientes en fetos y corderos*” constituye el segundo capítulo de esta tesis. Este artículo está escrito de acuerdo a las normas de la revista *Veterinaria (Montevideo)* y corresponde a la hipótesis y objetivo 1. El segundo artículo se titula “**Effect of natural grassland forage allowance offered to pregnant ewes on the muscle development of the fetuses and newborn lambs**” y constituye el tercer capítulo. Está escrito de acuerdo a las normas de la revista *Animal Production Science*. El cuarto capítulo de esta tesis corresponde a la discusión general, conclusiones globales e implicancias del problema estudiado.

2. OFERTA DE FORRAJE DE CAMPO NATURAL EN OVEJAS GESTANTES: EFECTOS SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO – FETAL Y LA PRIORIZACIÓN EN LA PARTICIÓN DE NUTRIENTES EN FETOS Y CORDEROS

Forage allowance of natural grassland pregnant ewes: Effect on the embryonic – fetal development and prioritization of nutrient partitioning in fetus and newborn lamb

Abud MJ^{1*}, Bielli A², Álvarez-Oxiley A¹, Freitas-de-Melo A³, López Pérez A¹, Pérez-Clariget R¹

¹ Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Garzón 780, C.P. 12900, Montevideo, Uruguay.

² Departamento de Morfología y Desarrollo, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, A. Lasplaces 1550, C.P. 11600, Montevideo, Uruguay.

³ Departamento de Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, A. Lasplaces 1550, C.P. 11600, Montevideo, Uruguay.

*Autor para correspondencia: mariabudclariget@gmail.com

2.1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos ofertas de forraje de campo natural desde 23 días antes de la concepción hasta el día 70 o 122 de gestación sobre el desarrollo fetal. Se usaron 36 ovejas Corriedale que fueron asignadas al azar a a) Alta oferta de forraje (AOF: 2,9-3,8 kg de materia seca (MS)/kg de peso vivo) y b) baja oferta de forraje (BOF: 1,4-2,6 kg de MS/kg de peso vivo). El útero grávido se extrajo de 18 ovejas gestantes de fetos machos simples a los 70 días de gestación. Dieciocho corderos machos de parto simple fueron sacrificados a las 12 horas de nacidos. Los fetos del grupo BOF tuvieron un menor peso del corazón y tamaño de los genitales externos y tendieron a tener menor peso fetal que los de AOF. Los corderos neonatos del grupo BOF tuvieron menor peso al nacer, de la carcasa, de los riñones, del hígado, de las glándulas adrenales, de los testículos y genitales externos, que los de AOF. No se encontraron diferencias en el peso del cerebro y cerebelo. Se registró una mayor relación peso de cerebro/peso de hígado en corderos de BOF. En situaciones de restricción nutricional durante la vida intrauterina de los ovinos, como la reportada en este experimento, se establece un orden de prioridad en el crecimiento de los órganos estudiados, con mayor prioridad para el encéfalo y el corazón y menor prioridad para los órganos genitales externos y carcasa.

Palabras clave: corderos, RCIU, subnutrición, genitales externos

2.2. SUMMARY

The aim of this work was to study the effect of two forage allowances of natural grassland from 23 days before conception until day 70 or 122 of gestation on fetal development. We used 36 ewes that were randomly assigned to two nutritional levels: high forage allowance (HFA: 2.9 -3.8 kg of dry matter (DM) /kg live weight) and low forage allowance (LFA: 1.4 -2.6 kg DM/kg live weight). In the day 70 of gestation 18 ewes were sacrificed and the gravid uterus removed. Eighteen male lambs were slaughtered at 12 hours of birth. The fetuses from LFA group had lower heart weight and size of the external genital organs and tended to have lower fetal weight than fetuses from HFA. Newborn lambs from LFA group had lower body weight, of the carcass, kidneys, liver, adrenal glands, testes and size of external genitalia than lambs from HFA group. No differences were found in the weight of the brain and cerebellum. There was found a higher weight of the brain/weight of the liver ratio in lambs from LFA group. In situations of nutritional restriction during intrauterine life in sheep, such as we reported in this study, it is possible to establish an order of priority in the growth of the studied organs, with a higher priority for the brain and the heart and a lower priority of the carcass and the external genital organs.

Key Words: lambs, IUGR, subnutrition, external genitals.

2.3. INTRODUCCIÓN

La subnutrición materna durante la gestación puede inducir un retardo del crecimiento intrauterino (RCIU) de su descendencia y promover alteraciones morfológicas, funcionales y desórdenes metabólicos con consecuencias negativas sobre la salud y el bienestar del individuo adulto (Barker, 2003; Calkins y Devaskar, 2011). Dado que la diferenciación y maduración de los distintos órganos se produce en momentos diferentes de la vida embrionaria-fetal, el efecto de la subnutrición dependerá del momento de la gestación en que ésta ocurra (Burton y Fowden, 2012).

Una subnutrición alrededor de la concepción o en el primer tercio de gestación no afectaría el peso al nacer de las crías, ni la tasa de crecimiento posnatal (Debus y col., 2012; Kenyon y Blair, 2014). Sin embargo, cuando la subnutrición ocurre durante la gestación media y tardía se reduce el peso al nacimiento (Kenyon y Blair, 2014), el crecimiento post natal temprano (Blair y col., 2011; Kenyon y col., 2011a¹) y altera el tamaño relativo de varios órganos como el hígado (Gao y col., 2014), riñones, corazón, timo, páncreas, el peso del músculo *Semitendinoso* (Osgerby y col., 2002) y testículos (Bielli y col., 2001) en ovinos. Incluso puede tener un impacto negativo sobre el peso y la calidad de la carcasa (Kenyon y Blair, 2014).

La producción ovina en países de clima subtropical o templado se basa fundamentalmente en sistemas pastoriles cuya base forrajera es el campo natural (Allen y col., 2011). La estacionalidad en la producción y calidad del forraje del mismo (Bermúdez y Ayala, 2005; Berretta y col., 1994) es una limitante dado que el periodo de menor producción de pasturas (invierno) coincide con la gestación de las ovejas. Esta situación podría conducir a que la cantidad y calidad de forraje en el invierno no logre satisfacer las demandas crecientes de nutrientes de la oveja gestante. Situación que se agrava debido a la pérdida de competitividad de los ovinos frente a otras producciones, que ha desplazado a la cría ovina a suelos cada vez más superficiales y de menor fertilidad. Además, se agrega el aumento de la variabilidad climática, que puede determinar disminuciones del aporte de nutrientes por periodo de sequía también en etapas tempranas de la gestación.

¹ Publicación identificada con una letra únicamente a efectos de esta tesis, a pesar de que se cite una sola publicación del mismo año.

A partir del postulado de Nathanielsz y Hanson (2003) que plantearon que ante una situación de hipoxia, el feto responde redistribuyendo el flujo sanguíneo para suministrar los nutrientes y oxígeno necesarios para órganos vitales como el cerebro o el corazón, sacrificando otros órganos como el hígado o riñones; por lo que nos preguntamos como respondería el feto ante una restricción nutricional intrauterina y como sería la priorización entre los diferentes órganos. En este trabajo se planteó la hipótesis de que una baja oferta de forraje de campo natural en ovejas gestantes produce un RCIU y el feto responde con una diferente priorización en la partición de los nutrientes, perjudicando más fuertemente el desarrollo del aparato reproductor y el peso de la carcasa, pilares de la producción de carne ovina, en comparación con otros órganos como por ejemplo el cerebro o corazón. Entonces el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos ofertas de forraje de campo natural en ovejas desde 23 días antes de la concepción hasta los 70 o 122 días de gestación sobre el peso y dimensiones corporales, peso de la carcasa y de los principales órganos y de las dimensiones de los genitales externos, como indicadores de RCIU y evaluar el grado de priorización de los distintos órganos.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos llevados a cabo fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República (CHEA, Uruguay).

Localización, animales, tratamientos y diseño experimental

El trabajo se llevó a cabo en la Estación Experimental Bernardo Rosengurt, Facultad de Agronomía, Cerro Largo, Uruguay (31°5´S, 54°15´O) entre marzo-setiembre 2013. Se utilizaron en total 32 hectáreas de campo natural pertenecientes a la unidad Fraile Muerto, divididas en 3 bloques, separados en 2 por alambrado eléctrico teniendo en cuenta la topografía, de tal manera que se contó con 3 parcelas por tratamiento. El pastoreo fue continuo y los animales tenían libre acceso al agua. Las principales especies pertenecían a los géneros *Stipa*, *Paspalum*, *Bromus*, *Coelorachis*, *Piptochaetium*, *Cynodon*, *Cardus*, *Bothriochloa* y *Andropogon*. Se

utilizaron 335 ovejas Corriedale, multíparas cuyo peso (PV) y condición corporal (CC, escala de 1 = emaciada a 5 = obesa; Jefferies, 1961) al inicio del trabajo eran: $48,9 \pm 0,3$ kg y $2,74 \pm 0,02$, en un diseño de bloques completos al azar.

En marzo (estación reproductiva), 23 días antes de la inseminación artificial (IA) fueron asignadas al azar, teniendo en cuenta su PV y CC a dos planos nutricionales. Los tratamientos fueron: Grupo alta oferta de forraje (AOF, n=178), donde las ovejas pastorearon sobre campo natural a 2,9 (marzo-junio) - 3,8 (julio) kg de materia seca (MS)/kg de PV y Grupo baja oferta (BOF; n=157): 1,4 (marzo-junio) - 2,6 (julio) kg MS/kg de PV (Sollenberger y col., 2005). El celo se sincronizó con dos dosis de PGF2 α análoga (10 mg, Dinoprost tromethamine, Lutalyse, Pfizer, Kalamazoo, MI, EEUU), separadas por 10 días. Las ovejas fueron inseminadas por vía pericervical utilizando semen fresco de 3 carneros, que fueron distribuidos homogéneamente entre los tratamientos. El diagnóstico de gestación y carga fetal se realizó por ecografía a los 30 días, utilizando ultrasonografía transrectal (Aloka ProSound 2, Aloka Co., Ltd., Tokio Japón, y sonda de 7,5 Mhz). Las ovejas que no quedaron preñadas fueron eliminadas del experimento. A los 60 días se reconfirmó la gestación y carga fetal y se realizó el diagnóstico del sexo fetal. A los 70 días de gestación (rango: 69-71 días), 18 ovejas (9 por tratamiento y 3 por parcela) gestantes de fetos machos únicos, fueron sacrificadas utilizando faena humanitaria (insensibilización previa al desangrado) y se extrajo el útero grávido. El resto de las hembras del grupo experimental se mantuvo en los tratamientos hasta la esquila pre parto, la que se realizó entre los días 121-122 de gestación, ese día las ovejas recibieron 100 mL de glicerina cruda (77% de glicerol) por animal. Posteriormente todas las ovejas pastorearon en una pradera de *Festuca arundinacea* (oferta de forraje 2,8 kg MS/kg PV). Desde 5 días antes de la esquila hasta el parto fueron suplementadas en forma grupal con 200 gr de afrechillo de arroz y 50 mL de glicerina cruda (77% de glicerol) por día y por animal. Los primeros 18 corderos machos de parto único (9 por tratamiento, 3 por parcela) fueron sacrificados utilizando tiopental intravenoso a las 12 horas de nacidos.

Determinaciones en la pastura y estimación del aporte energético y proteico de las pasturas y requerimientos de las ovejas

La oferta de forraje fue ajustada aproximadamente cada 30 días. Se realizaron cortes de pasturas en cada parcela para cuantificar la disponibilidad de materia seca por hectárea (kg MS/ha). La metodología utilizada para la determinación de la disponibilidad de forraje fue el método de doble muestreo (Haydock y Shaw, 1975), utilizando una escala de 5 puntos estimada por apreciación visual, según la heterogeneidad de la pastura. Se realizaron 3 repeticiones por cada punto de la escala y se tomó en cuenta la topografía de cada parcela. Previo al corte de cada punto de escala, se determinó la altura de la pastura mediante tres mediciones dentro del rectángulo (50 x 20 cm) en forma diagonal. Se estimó la altura promedio y la escala promedio de las parcelas (80-100 mediciones). Las muestras se pesaron en fresco y luego de 48 h en estufa a 60°C hasta lograr peso constante. Luego de estimar la cantidad de MS de la pastura se calculó la disponibilidad de forraje por ha. Se ajustó la ecuación de regresión entre altura de la pastura en cm y kg MS/ha, y entre el valor de escala visual y kg MS/ha, y se determinó cuál de las ecuaciones presentó mayor coeficiente de determinación. Con la función que se obtuvo se calculó la disponibilidad de forraje por ha utilizando los promedios de altura y de escala de cada parcela y se los sustituyó en la función. Para el ajuste de la oferta de forraje se utilizaron animales volantes pertenecientes a la misma majada y de similar peso y condición fisiológica que las ovejas experimentales. Se colectó una muestra de forraje al inicio del experimento y en los meses de invierno para analizar su composición química en el Laboratorio de Nutrición de la Facultad de Agronomía. Se evaluó el % de MS, de cenizas y de proteína cruda (PC) (AOAC, 2007), y el % de fibra detergente neutra (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) de la materia orgánica de forma secuencial con tecnología ANKOM (Van Soest y col, 1991).

El contenido energético del forraje ofrecido se estimó utilizando una ecuación derivada de NRC (2007) y los resultados de FDA (Energía metabolizable (EM, Mcal/kg MS) = 3.2534 – (0.0308FDA)) y el contenido proteico del forraje derivó de los resultados de los análisis de composición química del mismo. El consumo de forraje por oveja y por día, fue estimado como el forraje disponible/ha menos el remanente

(disponible del mes siguiente) al que se le sumó la tasa de crecimiento, dividido entre el periodo de días en que se hizo ambas estimaciones de forraje y los animales/ha. La energía metabolizable aportada por el afrechillo de arroz y la glicerina cruda se tomó de las tablas FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal). Se estimó el balance energético considerando las estimaciones de requerimientos energéticos y proteicos, según el estado fisiológico en el que se encontraban las ovejas y el peso, los que fueron extraídos de tablas. Los requerimientos energéticos de las ovejas fueron tomados de tablas de NRC de 2007, mientras que los proteicos se obtuvieron de tablas de NRC de 1985. La disponibilidad y altura del forraje por mes para las dos ofertas y el nivel energético y proteico aportado por la pastura en función de los requerimientos, se presenta en el cuadro I, y en el cuadro II se presenta la composición química del campo natural. En ambos casos se realizó un promedio de las 3 parcelas de cada tratamiento.

Cuadro I. Disponibilidad, altura y requerimientos energéticos y proteicos cubiertos con la oferta de forraje de campo natural, por tratamiento y por mes ($x \pm eem$).

Tratamiento	Mes	Disponibilidad	Altura	Requerimientos	
		(kg MS/ha)	(cm)	Energéticos	Proteicos
AOF	Marzo	1599,2±35,3	10,0±1,0	136%	108%
	Mayo	1752,8±268,5	15,5±1,5	126%	99%
	Junio	1523,1±173,9	13,4±0,1	102%	83%
	Julio	1245,6±146,8	13,0±0,4	108%	69%
BOF	Marzo	1599,2±35,3	10,0±1,0	106%	102%
	Mayo	1232,7±59,5	11,6±0,1	83%	70%
	Junio	958,7±107,6	9,6±0,8	74%	67%
	Julio	763,2±47,9	7,9±0,6	84%	50%

El primer registro de disponibilidad y altura del campo natural se estimó a fines de marzo, pero debido a las condiciones ambientales (precipitaciones), el segundo registro se realizó a principios de mayo y no fines de abril como estaba previsto.

Cuadro II. Composición química del campo natural.

Tratamiento	Mes	MS (%)	PC (%)	FDN (%)	FDA (%)	Cenizas (%)
AOF	Marzo	92,5	9,8	73,9	35,3	7,9
	Junio	90,6	8,3	70,2	34,0	6,5
	Julio	91,7	6,9	75,1	37,5	6,7
BOF	Marzo	92,5	9,8	73,9	35,3	7,9
	Junio	90,1	8,2	73,1	35,4	6,1
	Julio	90,5	6,5	75,9	37,6	6,3

La disponibilidad y altura de la pradera de *Festuca arundinacea* fue $1360,68 \pm 77,74$ kg y $13,20 \pm 0,75$ cm, respectivamente. La composición química fue: 12,55% de PC, 48,59% de FDN, 22,56% de FDA y 10,82% de cenizas. La composición química del afrechillo de arroz fue de: 88% MS, 14% PC, 9% FDA y 24% FDN y la composición de la glicerina cruda fue: 3 % agua, 6 % cenizas, 77 % glicerol (AOCS, 2012), 13 % materia grasa (AOAC, 2007) y 1% de metanol (provisto por ALUR). El afrechillo de arroz y la glicerina cruda eran premezclados antes de la suplementación. Los requerimientos energéticos y proteicos cubiertos con la pastura de festuca más la suplementación fueron de 202% y 160%, respectivamente.

Peso y condición corporal de las ovejas

El PV y la CC de las 18 ovejas sacrificadas a los 70 días de gestación fue registrado a los -23, 0, 24, 58 días previo al sacrificio (día 70) y en las 18 madres de los corderos utilizados, a los -23, 0, 24, 58, 96, 122 y 145, correspondiendo el día -23 al inicio de los tratamientos, día 0 al momento de la IA (concepción), el día 122 al fin de los tratamientos y el día 145 a dos días antes del parto (duración de la gestación en éste trabajo fue de 147 ± 2 días). Los pesos de las ovejas fueron corregidos por: peso de vellón (Gastel y col., 1995) y desarrollo fetal (Koong y col., 1975).

Registros de la glándula mamaria

Dos días antes de la fecha prevista de parto, se registró el diámetro antero-posterior, longitud y circunferencia de la glándula mamaria de las 18 ovejas y se estimó el volumen de la ubre de acuerdo a Bencini y Purvis (1990).

Entre las 12 y 14 horas después del parto se estimó la producción de calostro utilizando la técnica descrita por Sphor y col. (2011). Para ello se les inyectó 0,5 cc de oxitocina (Hipofamina® Dispert Laboratories, Montevideo, Uruguay) y se procedió al ordeño manual hasta vaciar la ubre. El procedimiento se repitió a las 4 h. Esta segunda muestra fue pesada y se estimó la producción de calostro en las 24 horas de acuerdo a Doney y col. (1979).

Mediciones en fetos de 70 días y corderos neonatos

Se registró el peso fetal al momento en que el feto fue extraído del útero grávido y luego de extraer todos los órganos internos se pesó la carcasa. Se registró también el peso del corazón, los riñones y pulmones. Se registraron la longitud del pene desde el borde anterior de la base del escroto hasta el extremo del prepucio, el diámetro anteroposterior de la base del escroto y la longitud del escroto en vista lateral desde la base al extremo distal, utilizando fotografías.

En los corderos neonatos se registró el peso antes de la eutanasia, y posteriormente se midió el perímetro torácico, la longitud cráneo – caudal, la longitud y perímetro del miembro posterior izquierdo. Se calculó el índice de crecimiento basado en el peso corporal y longitud cráneo-caudal de acuerdo a Gootwine (2013, $IC = PC/LCC^{1.5}$). También se registraron el peso del hígado, corazón, encéfalo, cerebro, cerebelo, las glándulas adrenales, riñones, testículos y el escroto y las dimensiones de los genitales externos mediante la misma metodología empleada en los fetos de 70 días. Por último se registró el peso de la carcasa de cada cordero.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS (SAS 9.0V; SAS Institute, Cary, NC, EEUU). El diseño experimental fue de bloques

completos al azar. Se aplicaron dos tratamientos (alta y baja oferta de forraje), en tres bloques y seis parcelas (tres parcelas por tratamiento) ubicadas en el terreno de modo que topográficamente fueran similares entre sí. La unidad experimental fue la parcela. Los datos de PV y CC de las ovejas fueron analizados utilizando modelos mixtos (PROC MIXED) de medidas repetidas, con el efecto del día de gestación como medida repetida. El modelo ajustado incluyó la oferta de forraje (AOF y BOF), día de gestación y su interacción como efecto fijo y el bloque como efecto aleatorio. Los datos pre tratamiento de PV y CC se utilizaron como covariables en el modelo correspondiente. El volumen de la glándula mamaria y la producción de calostro de las madres de los corderos neonatos, el PNAC, el peso fetal, de la carcasa y de los distintos órganos así como las dimensiones corporales y de los genitales externos de los fetos y de los corderos neonatos fueron analizados usando un modelo mixto (PROC MIXED). Los modelos ajustados incluyeron los efectos fijos de oferta de forraje (AOF y BOF) y el bloque como efecto aleatorio. La interacción entre la oferta de forraje y el bloque fue incluida en el modelo como un efecto aleatorio y cuando el parámetro de covarianza estimado fue cero o cercano a cero fue removido del modelo. Para las variables volumen de la glándula mamaria, producción de calostro, PNAC o peso fetal se incluyó como covariable en el modelo, el PV o la CC de la madre. Para las variables peso de carcasa, peso de órganos, dimensiones corporales y de los genitales externos de los fetos y los corderos neonatos se utilizó el peso fetal o el PNAC como covariable. En la sección Resultados, en cada cuadro se muestra el modelo ajustado sin la covariable. Cuando la covariable tuvo un efecto significativo, los resultados se comentan en el texto. Se calcularon correlaciones simples entre las distintas variables (utilizando PROC CORR en SAS). Se consideró significativo cuando $P \leq 0,05$ y tendencia cuando $0,05 < P \leq 0,1$. Los resultados se expresan como medias de mínimos cuadrados \pm eem.

Criterios para establecer la priorización en la partición de los nutrientes durante el desarrollo fetal

El peso fetal o del cordero está constituido por los pesos de los distintos compartimentos, órganos, huesos y agua que compone el organismo, por lo que a

corderos más livianos le corresponderían órganos más livianos. Para estudiar los efectos de los tratamientos sobre esta relación, se pueden utilizar análisis de cociente o análisis de covariable. El análisis de covarianza es estadísticamente más riguroso que el análisis del cociente. Elimina de la variable analizada aquella parte de la variación asociada con la covariable. En otras palabras “ajusta” la variable a un valor constante de la covariable. De esta manera, se estudia si el tratamiento tiene efecto sobre el peso de un órgano determinado, y si ese efecto está mediado o no por el efecto del tratamiento sobre el peso fetal. En caso de que el efecto se mantenga, se entendería que el tratamiento se amplifica para ese órgano y por lo tanto la prioridad en la distribución de nutrientes sería menor. Así como, los valores de P del efecto del tratamiento estarían sugiriendo un mayor o menor efecto sobre el órgano. También es considerado el momento (70 días de gestación o 12 h posparto) en que se manifieste el efecto. Estos análisis nos permiten estimar la priorización de nutrientes que hace el feto durante su desarrollo (Ponzoni, comunicación personal, 12 junio 2014).

2.5. RESULTADOS

Peso y condición corporal de las ovejas

Al momento del sacrificio (70 días de gestación) las ovejas del grupo BOF eran 9% más livianas ($P < 0,05$) y tenían una CC 15% menor ($P < 0,05$) que las de AOF (AOF: $50,4 \pm 0,9$ kg y $3,03 \pm 0,06$ unidades vs. BOF: $45,1 \pm 0,8$ kg y $2,49 \pm 0,05$ unidades, PV y CC, respectivamente). Las primeras estaban manteniendo PV ($P > 0,1$) mientras que las de BOF estaban perdiendo ($P < 0,05$). Se encontró una correlación positiva entre el PV y la CC ($r = 0,39$; $P = 0,0001$). Los resultados se presentan en la Figura 1.

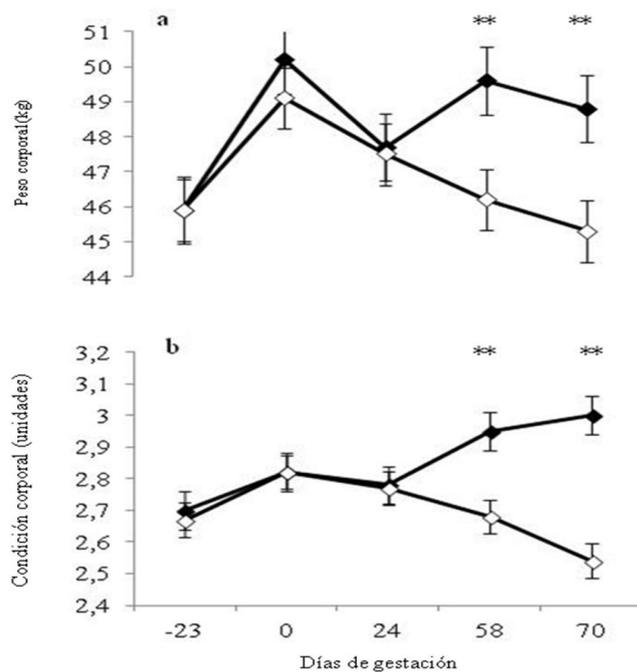


Figura 1. Peso (a) y condición corporal (b) de ovejas a las que se les ofreció 2,9-3,8 kg de materia seca (MS)/kg de peso vivo (PV) (■) o 1,4-2,6 kg MS/kg PV (□) de campo natural y sacrificadas a los 70 días de gestación. El día 0 corresponde al día de la concepción. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos dentro del mismo día de gestación ($P < 0,01$).

Como consecuencia de los tratamientos, las madres de corderos neonatos del grupo AOF fueron más pesadas (AOF: $47,3 \pm 0,22$ kg vs. BOF: $44,6 \pm 0,23$ kg; $P=0,016$) y tuvieron mayor CC (AOF: $2,71 \pm 0,03$ unidades vs. BOF: $2,50 \pm 0,03$ unidades; $P = 0,03$) que el grupo BOF. Ambas variables fueron afectadas por los días de gestación ($P < 0,0001$) y la interacción entre tratamiento y días de gestación ($P = 0,02$), pero no se encontraron efectos del bloque o de la interacción tratamiento y bloque ($P > 0,10$). El PV y la CC de las ovejas en ambos grupos aumentó ($P < 0,05$) en los primeros 23 días de tratamiento, pero las ovejas del grupo AOF ($50,0 \pm 0,60$ kg; $3,02 \pm 0,06$ unidades) llegaron a la IA con mayor ($P < 0,05$) PV y CC que las de BOF ($48,1 \pm 0,60$ kg; $2,72 \pm 0,08$ unidades). En ambos grupos en el momento de la IA se lograron los mayores ($P < 0,05$) PV y CC. A partir de ese momento las ovejas

del grupo AOF fueron más ($P < 0,05$) pesadas y tuvieron una CC mayor ($P < 0,05$) que las del grupo BOF durante el resto del experimento, excepto en el día 122 de gestación cuando la diferencia en CC se perdió ($P > 0,1$). Entre los días 58 y 96 de gestación (invierno, mes: julio), las ovejas de AOF perdieron ($P > 0,05$) 9% de su PV y 16% de su CC; el PV permaneció bajo hasta el ingreso a la pradera de *Festuca arundinacea*, cuando las ovejas ganaron ($P < 0,05$) en promedio 11% de su PV, en cambio la CC se mantuvo baja ($P > 0,1$) por el resto del periodo experimental. Desde el PV inicial hasta el PV al parto, el grupo AOF ganó en promedio 6% de peso, pero perdió el 9% de CC. Por su parte, las ovejas del grupo BOF perdieron ($P < 0,05$) PV y CC a partir del día 24 de gestación hasta el día 96. En promedio el PV disminuyó 16% y la CC 19%, y recuperaron ($P < 0,05$) alrededor de 12% de su PV durante el pastoreo sobre la pradera, por lo que llegaron al parto con un PV no diferente ($P > 0,1$) al PV inicial. En cambio la CC se mantuvo baja hasta el parto y disminuyó en promedio un 15% en relación a la CC inicial. Se encontró una correlación positiva entre el PV y la CC ($r = 0,62$; $P < 0,0001$). La evolución de PV y CC para ambos grupos se presenta en la Figura. 2.

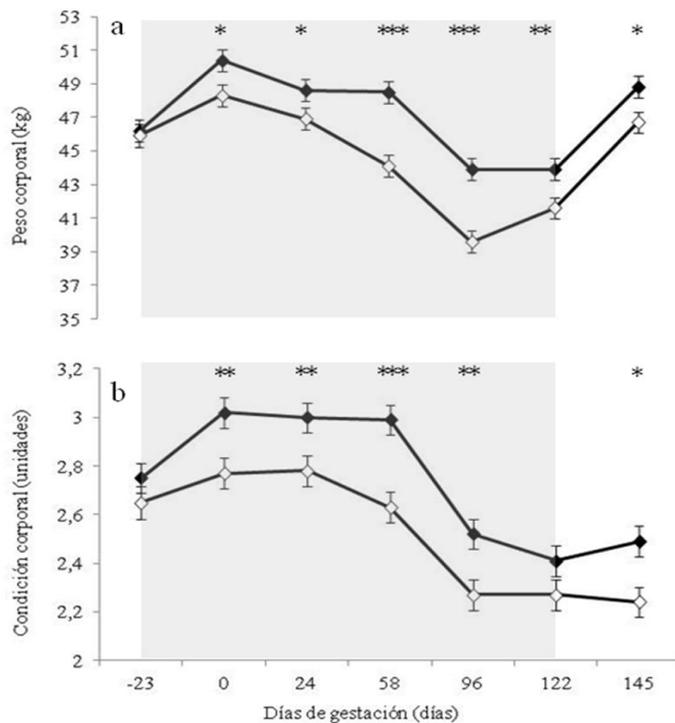


Figura 2. Peso (a) y condición corporal (b) de ovejas a las que se les ofreció 2,9-3,8 kg de materia seca (MS)/kg de peso vivo (PV) (■) o 1,4-2,6 kg MS/kg PV (□) de campo natural. El día 0 corresponde al día de la concepción. El área sombreada corresponde al periodo experimental. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos dentro del mismo día de gestación (*: P<0,05; ** P<0,01, *** P<0,001).

Glándula mamaria y producción de calostro en ovejas recién paridas

El tratamiento nutricional no afectó ($P > 0,51$) las dimensiones ni el volumen de la ubre ni la producción de calostro. El volumen de la ubre y la producción de calostro en las ovejas de AOF y BOF fueron de $707 \pm 155 \text{ cm}^3$ y $885 \pm 155 \text{ cm}^3$ y $213 \pm 30 \text{ mL}$ y $210 \pm 31 \text{ mL}$, respectivamente.

Peso corporal y de carcasa de fetos de 70 días y corderos neonatos

El peso de los fetos del grupo BOF a los 70 días tendió ($P = 0,08$) a ser 5% menor que el grupo AOF (cuadro III); esta tendencia se mantuvo cuando se incluyó el peso de la madre al momento del sacrificio como covariable ($P = 0,08$). Los corderos del grupo BOF fueron 11% más livianos ($P = 0,008$) al nacer que los

corderos del grupo AOF (cuadro IV), pero esta diferencia se perdió ($P = 0,20$) cuando se incluyó en el análisis el peso al parto de las madres. Cuando la CC de la madre se incluyó en el modelo como covariable, persistió una tendencia ($P = 0,10$) a que los corderos del grupo AOF fueran más pesados al nacer que los de BOF.

El peso de la carcasa de los fetos no fue afectado ($P = 0,22$) por los tratamientos (cuadro III), y este resultado no cambió ($P = 0,20$) cuando se incluyó en el modelo el peso del feto como covariable. Sin embargo, los corderos de AOF tuvieron una carcasa 16% más pesada ($P = 0,0005$) que los de BOF (cuadro IV) y la diferencia se mantuvo ($P = 0,02$) cuando se incluyó en el modelo el peso al nacer (PNAC) como covariable.

Dimensiones corporales de corderos neonatos

Los corderos de AOF tendieron a tener perímetros torácicos y de miembro posterior mayores ($P = 0,08$ y $P=0,07$, respectivamente) y miembros posteriores más largos ($P = 0,02$) que los de BOF, pero no se encontraron diferencias entre tratamientos en la longitud cráneo-caudal ($P= 0,44$). Estas diferencias desaparecieron cuando se incluyó en el modelo el PNAC como covariable ($P > 0,70$), excepto en la longitud del miembro posterior. Es decir, los corderos de BOF tendieron ($P=0,07$) a ser de menor altura que los corderos del grupo AOF. El índice de crecimiento ($IC = PNAC/LCC^{1,5}$) fue mayor ($P = 0,02$) en corderos pertenecientes al grupo AOF que en los de BOF. Los datos se presentan en el cuadro IV.

Peso de órganos de fetos y corderos

El peso del corazón de los fetos de BOF fue 12% menor ($P = 0,04$) que el de los fetos de AOF, sin embargo cuando se incluyó el peso fetal como covariable esta diferencia desapareció ($P = 0,12$). El peso de los pulmones y riñones no fue influido ($P > 0,16$) por los tratamientos. Los resultados se presentan en el cuadro III.

En los corderos neonatos no se observaron diferencias ($P > 0,23$) entre tratamientos en los pesos del corazón, cerebro, cerebelo y encéfalo. Esta situación no cambió cuando se incluyó el PNAC como covariable ($P > 0,76$). Se observó una reducción ($P = 0,02$) del 20% en el peso del hígado en los corderos nacidos de BOF

comparado con los de AOF y un menor ($P = 0,04$) peso de los riñones del orden del 15%. Sin embargo, estas diferencias desaparecieron ($P > 0,38$) cuando se incluyó el PNAC como covariable en el modelo. Los pesos de las glándulas adrenales de los corderos de AOF fueron mayores ($P = 0,02$) que los de los corderos de BOF, esta diferencia se mantuvo ($P = 0,04$) cuando se incluyó el PNAC como covariable. Los corderos del grupo BOF presentaron una reducción ($P = 0,02$) en el peso de los testículos del 16% y se observó una tendencia a que el peso del escroto fuera 17% menor ($P = 0,07$) al de los corderos de AOF. Estas diferencias desaparecieron cuando el PNAC fue incluido como covariable ($P > 0,24$). Los resultados se presentan en el cuadro IV.

Dimensiones de genitales externos de fetos de 70 días y corderos neonatos

El tratamiento afectó la longitud del pene de los fetos de 70 días de edad y de los corderos neonatos. Los fetos y corderos de madres de AOF tuvieron penes 20% y 16% más largos ($P < 0,05$) que aquellos hijos de madres del grupo BOF, respectivamente (cuadros III y IV). En los fetos esta diferencia se mantuvo ($P = 0,005$) aún cuando se incluyó en el modelo el peso fetal como covariable, sin embargo en corderos la diferencia se perdió ($P = 0,38$). La longitud del escroto no fue afectada ($P = 0,40$) por los tratamientos y no se encontraron diferencias entre corderos de AOF y BOF (cuadro IV), tampoco cuando se incluyó en el modelo el PNAC como covariable ($P = 0,89$). Los fetos de madres de AOF tuvieron escrotos 20% más largos ($P = 0,001$) que aquellos hijos de madres del grupo BOF (cuadro III). En los fetos esta diferencia se mantuvo ($P = 0,003$) aún cuando se incluyó en el modelo el peso fetal como covariable. También se registraron diferencias en la base del escroto (cuadro III y IV) en fetos de 70 días ($P = 0,001$) y una tendencia en los corderos ($P = 0,06$), pero cuando se incluyó el peso como covariable en el modelo, en los fetos la diferencia se mantuvo ($P=0,005$) y en los corderos se perdió ($P=0,28$).

Cuadro III. Peso corporal, de carcasa y de órganos, dimensiones de genitales externos ($\bar{x} \pm eem$) de fetos de 70 días, a cuyas madres se les ofreció 2,9-3,8 kg de materia seca (MS)/kg de peso vivo (PV) o 1,4-2,6 kg MS/kg PV de campo natural desde 23 días antes de la concepción.

	AOF	BOF	P-valor
Peso fetos 70 d (g)	151,3 ± 5,2	143,9 ± 5,1	0,08
Peso carcasa fetos 70 d (g)	80,0 ± 3,2	76,9 ± 3,1	0,22
Peso de corazón (g)	1,28 ± 0,05	1,13 ± 0,05	0,04
Peso de riñones (g)	1,46 ± 0,09	1,34 ± 0,09	0,16
Peso de pulmón (g)	4,97 ± 0,2	4,81 ± 0,2	0,57
Longitud pene (cm)	2,49 ± 0,09	1,99 ± 0,07	0,001
Longitud escroto (cm)	1,34 ± 0,049	1,08 ± 0,041	0,001
Base escroto (cm)	1,07 ± 0,033	0,87 ± 0,029	0,001

Cuadro IV. Peso al nacimiento, de carcasa y de órganos, dimensiones corporales y de genitales externos de corderos de 12 horas de edad ($x \pm eem$), a cuyas madres se les ofreció 2,9-3,8 kg de materia seca (MS)/kg de peso vivo (PV) o 1,4-2,6 kg MS/kg PV de campo natural desde 23 días antes de la concepción hasta 122 días de gestación.

	AOF	BOF	P-valor
Peso corderos 12 h (kg)	5,1 ± 0,1	4,5 ± 0,1	0,008
Peso carcasa corderos 12 h (kg)	2,45 ± 0,06	2,07 ± 0,06	0,0005
Perímetro miembro posterior (cm)	20,8 ± 0,3	19,8 ± 0,3	0,07
Largo miembro posterior (cm)	12,0 ± 0,2	11,2 ± 0,2	0,02
Perímetro torácico (cm)	39,1 ± 0,9	37,3 ± 0,9	0,08
Longitud cráneo-caudal (cm)	47,6 ± 0,6	46,9 ± 0,6	0,44
Índice de crecimiento*	15,70 ± 0,40	14,00 ± 0,40	0,02
Peso de corazón (g)	42,8 ± 1,9	39,3 ± 1,9	0,23
Peso de cerebro (g)	43,0 ± 0,8	42,6 ± 0,8	0,74
Peso de cerebelo (g)	6,07 ± 0,26	6,10 ± 0,26	0,95
Peso de encéfalo (g)	57,8 ± 1,2	57,0 ± 1,2	0,65
Peso de hígado (g)	126,8 ± 6,9	100,9 ± 6,9	0,02
Peso de riñón (g)	30,5 ± 1,6	25,5 ± 1,6	0,04
Peso de glándulas adrenales (g)	0,97 ± 0,04	0,82 ± 0,04	0,02
Longitud pene (cm)	7,55 ± 0,41	6,27 ± 0,42	0,05
Longitud escroto (cm)	4,75 ± 0,26	4,42 ± 0,27	0,40
Base escroto (cm)	3,49 ± 0,20	2,88 ± 0,21	0,06
Peso de testículos (g)	1,92 ± 0,08	1,62 ± 0,08	0,02
Peso de escroto (g)	9,8 ± 0,6	8,2 ± 0,60	0,07
Rel. cerebro/hígado	0,35 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,02

* Índice de crecimiento (IC): PNAC/LCC^{1,5}

2.6. DISCUSIÓN

La subnutrición materna induce un RCIU que se refleja en menores pesos al nacer tanto en humanos (Calkins y Devaskar, 2011), como en animales domésticos

(Wu y col., 2006, 2004), incluidos los ovinos (Morrison, 2008; Wallace y col., 2005). En el presente trabajo, de acuerdo a los indicadores utilizados para diagnosticar RCIU, los corderos del grupo BOF sufrieron un retardo en su desarrollo embrionario - fetal comparado con los corderos de AOF. En efecto, tanto las dimensiones corporales con proporciones alteradas (corderos de BOF del mismo largo, pero más angostos, de menor altura y miembros más finos que los de AOF), como la mayor relación peso cerebro/peso del hígado en los corderos de BOF, son indicadores utilizados para identificar fetos o recién nacidos humanos que han sufrido RCIU (Gluckman y Pinal, 2003; Mitchell, 2001; Wu y col., 2006, 2004). Además, los corderos del tratamiento BOF presentaron un menor IC, un índice más apropiado para evaluar el crecimiento fetal en ovinos que los índices utilizados en humanos (Gootwine, 2013). Estos resultados en conjunto sugerirían que la restricción nutricional sufrida por las madres de BOF indujeron un RCIU comparado con el grupo AOF.

La subnutrición durante la primera mitad de la gestación en ovejas tiene un impacto diferente sobre el peso fetal dependiendo de la magnitud de la restricción. Restricciones del 60 y 70% de los requerimientos no disminuyen el peso fetal ni a los 45 (Osgerby y col., 2002), 78 (Clarke y col., 1998) o 90 días de gestación (Osgerby y col., 2002). Sin embargo, restricciones del 50% de los requerimientos impactan negativamente sobre el peso fetal a los 78 días (Vonnahme y col., 2003; Zhu y col., 2004). La relación entre las variaciones en el peso de la madre y el peso fetal a esta altura de la gestación no parece clara. Una reducción del 7 % del PV de las madres estuvo asociada a una disminución del 32% (Vonnahme y col., 2003) del peso fetal. Sin embargo, en nuestro trabajo, un cambio similar de PV en las madres estuvo asociado a una reducción de solo el 5% en el peso fetal, por lo que la magnitud de la restricción a los fetos, en éste caso, no habría sido tan severa. Aunque, los animales en pastoreo gastan energía en cosechar el alimento, buscar el agua y controlar la temperatura ya que están sometidos a las condiciones ambientales, por lo que en la práctica, la restricción en los sistemas pastoriles a cielo abierto todo el año, deberían tener efectos más intensos comparada con similares restricciones en condiciones controladas.

En el presente trabajo, el resultado del análisis de covarianza sugiere que la diferencia en el peso fetal debida al tratamiento no se explicaría solamente por la diferencia en el PV de las madres. Aún más, el PV de la madre y el peso fetal no estuvieron correlacionados ($P=0,88$); la relación con las reservas corporales parece más importante (CC y el peso fetal: $r=0,47$; $P=0,05$) que con el PV a esta altura de la gestación. Sin embargo, en la literatura existen reportes de cambios en la CC (Osgerby y col., 2002) o PV (Clarke y col., 1998) sin cambios en el peso fetal. El peso fetal en la primera mitad de la gestación sería menos importante en el desarrollo fetal, que el proceso de diferenciación que se lleva a cabo en el embrión-feto (Beltrán y Alomar, 2011). Aunque esta alteración podría causar efectos negativos a largo plazo en la vida productiva de las crías. Es posible que las diferencias de dietas, tipo de animales utilizados, periodos en que se aplican los tratamientos (antes o después de la concepción) y condiciones en que se realizan los trabajos (estabulados o en pastoreo) puedan explicar al menos en parte las diferencias entre trabajos.

La alimentación de las ovejas en el último tercio de la gestación influye más el PNAC de las crías que la alimentación en el primer y segundo tercio de gestación (Kenyon y Blair, 2014). Aún más, subnutriciones no severas durante ese periodo pueden ser compensadas por un aumento en el plano nutricional en el último tercio (Kenyon y Blair, 2014). En el presente trabajo, 23 días de una mejora del plano nutricional que se reflejó en un aumento del 12% de PV de las ovejas, pero no modificó la CC, no compensó las diferencias de aporte de forraje durante el resto de la gestación, lo que se reflejó en diferencias en el PNAC de los corderos. Coincidentemente con lo observado por Bielli y col. (2002), que reportaron una disminución del 12% en el PNAC de corderos machos de gestación simple cuyas madres habían sido sometidas a 70% o 110% de los requerimientos de energía metabolizable desde la semana 10 de gestación hasta el parto, en el presente trabajo el PNAC de los corderos de BOF fue 11% menor que los de AOF. Aunque los mecanismos involucrados en esta reducción no necesariamente serían los mismos. En el primer trabajo no se observaron cambios en el peso de la placenta o número de cotiledones (Pérez-Clariget y col., 2003). Sin embargo, en el presente trabajo, resultados preliminares (Álvarez-Oxiley y col., 2014) sugieren que los tratamientos

aplicados podrían haber afectado el intercambio de nutrientes de la madre al feto, desde que se observó un menor peso total de los placentomas en las ovejas BOF a los 70 días de gestación. Aunque más información será necesaria para confirmar el rol de la placenta como mediador del RCIU en esta situación, ya que también fue observado (Álvarez-Oxiley y col., 2014) una conversión más acentuada en el grupo BOF de placentomas de tipo A hacia los tipos más eficientes B, C y D (Vatnick y col., 1991; Vonnahme y col., 2006).

La ausencia de diferencias en el volumen de la ubre y de la producción de calostro podría ser debida al aumento del plano nutricional durante los últimos 23 días de gestación. Si bien la subnutrición durante la gestación disminuye el volumen de la ubre y la producción de calostro, la glándula mamaria parece responder a los efectos de corto plazo de la nutrición, ya que una mejora del plano nutricional antes del parto estimula la mamogénesis y la lactogénesis (Banchero y col., 2009, 2002). Esta situación podría haber ocurrido en nuestro experimento con el aumento del plano nutricional antes del parto.

El RCIU se asocia con un desarrollo diferencial de órganos (Gootwine, 2013; Osgerby y col., 2002; Vonnahme y col., 2003; Wu y col., 2004). A los 70 días de gestación, los fetos presentaban diferencias en el peso del corazón, pero sobre todo en las dimensiones de los genitales externos. Estas últimas parecen no ser explicadas totalmente por la diferencia de pesos fetales, por lo que es posible asumir que frente a una restricción nutricional, los fetos no priorizaron a los genitales externos en la distribución de nutrientes. De acuerdo a nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se reporta el efecto de la subnutrición intrauterina sobre la dimensión de los genitales externos en el feto ovino u otros fetos de mamífero.

En los corderos neonatos sometidos a BOF se observaron diferencias de peso en riñón, hígado, y glándulas adrenales. Sin embargo, de acuerdo a los valores de P obtenidos en el análisis de varianza y a los resultados de los análisis de covarianza, parece que los riñones tienen mayor priorización en la distribución de nutrientes, mientras que las glándulas adrenales fueron las más afectadas y el hígado tendría una priorización intermedia. Se debe tener en cuenta que el presente trabajo estudia los pesos de los órganos y no características morfo-fisiológicas o moleculares.

Coincidiendo con el postulado de Nathanielsz y Hanson, (2003), los tratamientos no influyeron el peso de los órganos del sistema nervioso central. Frente a una restricción nutricional, el feto prioriza en la distribución de nutrientes a los órganos que percibe como vitales para su desarrollo como el cerebro y “sacrifica” el hígado. La ausencia de diferencia entre los pesos del cerebro y cerebelo entre tratamientos se mantuvo cuando se incluyó el PNAC como covariable, confirmando la priorización dada a estos órganos (corderos más livianos no tuvieron cerebros o cerebelos más livianos).

A diferencia de los fetos de 70 días, los corderos de BOF también priorizaron el corazón contrariamente a lo que reportó Jaquier y col. (2012), en que las crías machos cuyas madres perdieron 10-15% de peso corporal en la periconcepción tuvieron menor peso relativo del corazón en comparación con las crías de las ovejas control. Aunque coincidió con un trabajo anterior de nuestro equipo (Pérez-Clariget y col., 2003) y con el trabajo de Long y col. (2009). Es posible que las demandas circulatorias más exigentes a medida que el feto crece obligaran a priorizar el corazón en una etapa posterior a los 70 días.

La diferencia entre los pesos testiculares de los neonatos coincidió con lo reportado previamente por Bielli y col. (2001). Sin embargo, en el presente trabajo, las diferencias desaparecieron cuando se incluyó en el modelo el PNAC como covariable, lo que sugiere que la priorización del desarrollo testicular en el neonato no fue afectada por el tratamiento.

Los efectos de la subnutrición intrauterina sobre el peso de la carcasa han sido reportados en bovinos (Du y col., 2010), en cerdos (Bee, 2004) y en ovinos (Asmad y col., 2012; Ford y col., 2007; Jaquier y col., 2012). La restricción nutricional en el grupo BOF durante la primera mitad de la gestación parece no haber sido lo suficientemente severa como para inducir cambios en el peso del conjunto de los órganos que constituyen la carcasa (músculos y huesos, fundamentalmente) a los 70 días. Sin embargo, la restricción inducida por el tratamiento BOF a partir de los 70 días hasta los 122 días de gestación indujo una reducción del peso de la carcasa en los corderos neonatos. Si bien, como era de esperar, los corderos más livianos tuvieron pesos de carcasas más livianas, de acuerdo al análisis de covarianza, la

restricción nutricional parece haber amplificado este efecto. Aún más, los corderos del grupo BOF tuvieron rendimientos menores a los del grupo AOF y la relación peso carcasa/PNAC fue mayor en los corderos de AOF en comparación con los de BOF. Es posible que la mayor restricción nutricional a partir de la segunda mitad de la gestación sumado a las demandas crecientes del feto (Koong y col., 1975), obligaran a una priorización de los órganos vitales en desmedro de los músculos y huesos que conforman la carcasa y que no fue compensada por 23 días de alimentación *ad libitum*.

2.7. CONCLUSIONES

Una oferta de forraje de 1,4-2,6 kg MS/kg PV provoca una subnutrición intrauterina y un crecimiento diferencial de órganos en fetos de 70 días y corderos neonatos. Estos priorizan el crecimiento de los órganos centrales en desmedro de órganos periféricos. La prioridad es máxima para los órganos del sistema nervioso central y corazón, intermedia para órganos metabólicos, menor para los testículos y muy baja para los genitales externos y carcasa. Esta situación puede conducir a repercusiones en el animal adulto ya que los corderos de BOF podrían presentar en el futuro, diferencias morfológicas y fisiológicas en relación a los de AOF, por lo que sometidos a similares manejos nutricionales sus rendimientos productivos podrían llegar a ser menores.

2.8. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al director Ing. Agr Carlos Mantero, jefatura de operaciones: Ings. Agrs. Eduardo Lena y Xenia Viera y al personal de campo, Tec. Pec. Ignacio Sosa, Srs. Carlos García y Baltazar Martínez de la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt por el cuidado de los animales y apoyo durante el trabajo experimental. También se agradece a los Drs. Carlos López Mazz y Mariel Regueiro por la realización de las ecografías. A los Drs. Patricia Genovese, Victoria Riaño y Javier Ithurralde por el apoyo en los muestreos. El primer autor tenía una beca (POS_NAC_2012_1_9235) de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Montevideo, Uruguay).

2.9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allen VG, Batello C, Berretta EJ, Hodgson J, Kothmann M, Li X, McIvor J, Milne J, Morris C, Peeters A, Sanderson M. (2011). An international terminology for grazing lands and grazing animals. *Grass Forage Sci* 66: 2–28.
2. Álvarez-Oxiley A, López Pérez MB, Añon V, López Pérez AG, Abud MJ, Bielli A, Regueiro M, Lopez Mazz C, Rico DE, Pérez-Clariget R. (2014). Restricción nutricional durante la gestación en ovejas pastoreando campo natural: Efectos sobre el desarrollo de la placenta a los 70 días de gestación. Congreso de la Asociación Uruguaya de Producción Animal. 5°, Montevideo, Uruguay. CD-Rom.
3. AOAC. (2007). *Official Methods of Analysis*, 18th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, D.C., USA.
4. AOCS. (2012). *Official Methods and Recommended Practices*, 103rd ed. Amer. Oil Chem. Soc., California, USA.
5. Asmad K, Nakagawa S, Lopez-Villalobos N, Kenyon PR, Pain SJ, Blair HT. (2012). Effects of maternal nutrition during pregnancy on the growth and reproductive development of male sheep: a meta-analysis. *Proceedings of the NZ Soc Anim Prod* 72: 51-57.
6. Banchemo GE, Quintans G, Lindsay DR, Milton JT. (2009). A pre-partum lift in ewe nutrition from a high-energy lick or maize or by grazing *Lotus uliginosus* pasture, increases colostrum production and lamb survival. *Anim* 3: 1183-1188.
7. Banchemo G, Quintans G, Milton J, Lindsay D. (2002). Supplementation during the last week of pregnancy of Corriedale ewes can improve colostrum and milk yield. *Proc Aust Soc Anim Prod* 24: 273.
8. Barker DJP. (2003). The developmental origins of adult disease. *Eur J Epidemiol* 18: 733-736.
9. Bee G. (2004). Effect of early gestation feeding, birth weight, and gender of progeny on muscle fiber characteristics of pigs at slaughter. *J Anim Sci* 82: 826-836.

10. Beltrán I, Alomar D. (2011). Undernutrition during early gestation in sheep: Long term impact on the offspring. *Agro Sur* 39 (3): 115-124.
11. Bencini R, Purvis IW. (1990). The yield and composition of milk from Merino sheep. *Proc Aust Soc Anim Prod* 18: 144-148.
12. Bermúdez R, Ayala W. (2005). Producción de forraje de un campo natural de la zona de lomadas del este. En: Gómez Miller R, Albicette MM. Seminario de actualización técnica en manejo de campo natural, Serie Técnica 151, Montevideo: INIA, pp 33-40.
13. Berretta EJ, San Julián R, Montossi F, Silva JA. (1994). Pasturas naturales y producción ovina en la región de basalto en Uruguay. Congreso mundial de Merino. 4°, Montevideo, Uruguay, pp 245-262.
14. Bielli A, Pérez-Clariget R, Pedrana G, Milton JTB, López A, Blackberry M, Duncombe G, Rodríguez-Martínez H, Martin GB. (2002). Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reprod Fertil Dev* 14: 333-337.
15. Bielli A, Katz H, Pedrana G, Gastel MT, Moraña A, Castrillejo A, Lundeheim N, Forsberg M, Rodriguez-Martinez H. (2001). Nutritional management during fetal life and postnatal life, and the influence on testicular stereology and Sertoli cell numbers in Corriedale rams. *Small Rumin Res* 40: 62-71.
16. Blair HT, Van der Linden DS, Jenkinson CMC, Morris ST, Mackenzie DDS, Peterson SW, Firth EC, Kenyon PR. (2011). Do ewe size and nutrition during pregnancy affect foetus and foetal organ weight in twins?. *Livestock Sci* 142: 99-107.
17. Burton GJ, Fowden AL. (2012). Review. The placenta and developmental programming: Balancing fetal nutrient demands with maternal resource allocation. *Placenta* 33: S23-S27.
18. Calkins K, Devaskar SU. (2011). Fetal origins of adult disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 41: 158-76.
19. Clarke L, Heasman L, Juniper DT, Symonds ME. (1998). Maternal nutrition in early-mid gestation and placental size in sheep. *Br J Nutr* 79: 359-364.

20. Debus N, Chavatte-Palmer P, Viudes G, Camous S, Roséfort A, Hassoun P. (2012). Maternal periconceptional undernutrition in Merinos d'Arles sheep: 1- Effects of pregnancy and reproduction results of dams and offspring growth performances. *Theriogenology* 77: 1453-1465.
21. Doney JM, Peart JN, Smith WF, Louda F. (1979). A consideration of the technique for estimation of milk yield by suckled sheep and a comparison of estimates obtained by two methods in relation to the effect of breed, level of production and stage of lactation. *J Agr Sci* 92: 123-132.
22. Du M, Tong J, Zhao JX, Underwood KR, Zhu MJ, Ford SP, Nathanielsz PW. (2010). Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *J Anim Sci* 88: 51-60.
23. FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal) (s/f), Tablas FEDNA para glicerina y salvado de arroz blanco. Consultada 2 setiembre de 2015. Disponible en: http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/glicerina-85-actualizado-abril-2012.
http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/salvado-de-arroz-blanco-14-ee.
24. Ford SP, Hess BW, Schwoppe MM, Nijland MJ, Gilbert JS, Vonnahme KA, Means WJ, Han H, Nathanielsz PW. (2007). Maternal undernutrition during early to mid-gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in male offspring. *J Anim Sci* 85: 1285-1294.
25. Gao F, Yingchun L, Lingyao L, Ming L, Chongzhi Z, Changjin A, Xianzhi H. (2014). Effects of maternal undernutrition during late pregnancy on the development and function of ovine fetal liver. *Anim Reprod Sci* 147: 99-105.
26. Gastel T, Bielli A, Perez R, Lopez A, Castrillejo A, Tagle R, Franco J, Laborde D, Forsberg M, Rodriguez-Martinez H. (1995). Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corriedale rams. *Anim Reprod Sci* 40: 59-75.
27. Gluckman PD, Pinal CS. (2003). Regulation of fetal growth by the somatotrophic axis. *J Nutr* 133: 1741-1746.

28. Gootwine E. (2013). Meta-analysis of morphometric parameters of late-gestation fetal sheep developed under natural and artificial constraints. *J Anim Sci* 91: 111–119.
29. Haydock KP, Shaw NH. (1975). The comparative yield method for estimating dry matter yield of pastures. *Aust J Exp Agr Anim Husb* 5: 663-670.
30. Jaquiery AL, Oliver MH, Honeyfield-Ross M, Harding JE, Bloomfield FH. (2012). Periconceptional undernutrition in sheep affects adult phenotype only in males. *J Nutr Metab* 2012: 1-7.
31. Jefferies BC. (1961). Body condition scoring and its use in management. *Tasmanian J Agr* 32: 19-21.
32. Kenyon PR, Blair HT. (2014). Foetal programming in sheep – Effects on production. *Small Rum Res* 118: 16-30.
33. Kenyon PR, Van der Linden DS, Blair HT, Morris ST, Jenkinson CMC, Peterson SW, Mackenzie DDS, Firth EC. (2011a). Effects of dam size and nutritional plane during pregnancy on lamb performance to weaning. *Small Rum Res* 97: 21-27.
34. Koong LJ, Garrett WN, Rattray PV. (1975). A Description of the Dynamics of Fetal Growth in Sheep. *J Anim Sci* 41: 1065-1068.
35. Long NM, Vonnahme KA, Hess BW, Nathanielsz PW, Ford SP. (2009). Effects of early gestational undernutrition on fetal growth, organ development, and placentomal composition in the bovine. *J Anim Sci* 87: 1950-1959.
36. Mitchell ML. (2001). Fetal Brain to Liver Weight Ratio as a Measure of Intrauterine Growth Retardation: Analysis of 182 Stillborn Autopsies. *Mod Pathol* 14: 14-19.
37. Morrison JL. (2008). Sheep models of intrauterine growth restriction: Fetal adaptations and consequences. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35: 730-743.
38. Nathanielsz PW, Hanson MA. (2003). The fetal dilemma: spare the brain and spoil the liver. *J Physiol* 548: 333.

39. NRC - National Research Council. (2007). Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and new world camelids. Washington, DC, USA. National Academy Press. 362 p.
40. NRC - National Research Council. (1985). Nutrient requirements of sheeps. Sixth Revised Edition. Washington, D.C., USA. 111 p.
41. Osgerby JC, Wathes DC, Howard D, Gadd TS. (2002). The effect of maternal undernutrition on ovine fetal growth. *J Endocr* 173: 131-141.
42. Pérez-Clariget R, Banchemo G, López A, Blackberry MA, Blache D, Milton JTB, Martin GB. (2003). A low energy diet fed to pregnant ewes affects the metabolism of the ewes and their lambs. *World conference on Animal Production*. 9°, Porto Alegre, Brazil, pp 224.
43. Sollenberger LE, Moore JE, Allen VG, Pedreira CGS. (2005). Reporting Forage Allowance in Grazing Experiments. *Crop Sci* 45: 896-900.
44. Sphor L, Banchemo G, Correac G, Osórioa MTM, Quintans G. (2011). Early prepartum shearing increases milk production of wool sheep and the weight of the lambs at birth and weaning. *Small Rum Res* 99: 44-47.
45. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Symposium, Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dary cattle. *J Dairy Sci* 74 (10): 3583-3597.
46. Vatnick I, Schoknecht PA, Darrigrand R, Bell AW. (1991). Growth and metabolism of the placenta after unilateral fetectomy in twin pregnant ewes. *J Dev Physiol* 15: 351-356.
47. Vonnahme KA, Hess BW, Nijland MJ, Nathanielsz PW, Ford SP. (2006). Placentomal differentiation may compensate for maternal nutrient restriction in ewes adapted to harsh range conditions. *J Anim Sci* 84: 3451-3459.
48. Vonnahme KA, Hess BW, Hansen TR, McCormick RJ, Rule DC, Moss GE, Murdoch WJ, Nijland MJ, Skinner DC, Nathanielsz PW, Ford SP. (2003). Maternal undernutrition from early- to mid-gestation leads to growth retardation, cardiac ventricular hypertrophy, and increased liver weight in the fetal sheep. *Biol Reprod* 69: 133-140.

49. Wallace JM, Regnault TRH, Limesand SW, Hay WW, Anthony RV. (2005). Investigating the causes of low birth weight in contrasting ovine paradigms. *J Physiol* 565: 19-26.
50. Wu G, Bazer FW, Wallace JM, Spencer TE. (2006). Board-invited review: Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *J Anim Sci* 84: 2316–2337.
51. Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, Spencer TE. (2004). Maternal nutrition and fetal development. *J Nutr* 134: 2169-2172.
52. Zhu MJ, Ford SP, Nathanielsz PW, Du M. (2004). Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biol Reprod* 71: 1968-1973.

**3. EFFECT OF NATURAL GRASSLAND FORAGE ALLOWANCE
OFFERED TO PREGNANT EWES ON THE MUSCLE DEVELOPMENT OF
THE FETUSES AND NEWBORN LAMBS**

M.J. Abud^{a,c}, A. Bielli^b, J. Ithurralde^b, A. Alvarez-Oxiley^a, A. Casal^a, R. Pérez-Clariget^a

^a Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Garzón 780, C.P. 12900, Montevideo, Uruguay.

^b Departamento de Morfología y Desarrollo, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, A. Lasplacas 1550, C.P. 11600, Montevideo, Uruguay.

^c Corresponding author. Email: mariabudclariget@gmail.com

3.1. ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate two forage allowances of natural grassland: High forage allowance (HFA: 2.9-3.8 kg dry matter (DM)/kg live weight) and low forage allowance (LFA: 1.4-2.6 kg DM/kg live weight), since 23 days before conception until either 70 or 122 days of gestation on the development and growth of *Longissimus lumborum* (LL) y *Semitendinosus* (ST) muscle (muscle fascicle density, diameter of muscle fascicle, number of nuclei/muscle fascicle, RNA concentration in 70-days fetuses, fiber density, diameter of muscle fiber, number of nuclei/muscle fiber, DNA, RNA and protein concentration in newborn lambs and muscle tissue proportion in both). We observed changes in histological and molecular aspects in both muscles. Fascicle diameter, number of nuclei/muscle fascicle and muscle tissue proportion were higher in HFA than in LFA fetuses, for both LL and ST muscles. No difference was registered in muscle fascicle density between fetuses from HFA or LFA and fetuses from HFA had higher RNA concentration in ST muscle. Fiber diameter, number of nuclei/muscle fiber, muscle tissue proportion and DNA concentration were higher in HFA than in LFA lambs, in both muscles. We also found higher fiber density in LL muscle, a trend to have higher fiber density in ST muscle and a lower protein/DNA ratio in both muscles, in HFA than in LFA lambs. Subnutrition during pregnancy caused negative alterations in histological and molecular aspects of muscle development, which may have future impact on adult life.

Key words: subnutrition, sheep, muscle development

3.2. INTRODUCTION

The term "fetal programming" describes the permanent consequences in offspring provoked by environmental effects during key stages of their intrauterine development (Rhind *et al.*, 2001). Intrauterine muscle development is due to hyperplastic and hypertrophic processes, while postnatal muscle growth is based only on hypertrophy (Stickland, 1978; Zhu *et al.*, 2004). Thus, intrauterine muscle development is critical because there is no cellular proliferation after birth. The increase in muscle mass during postnatal life is due to an increase in the diameter of the muscle fiber (Zhu *et al.*, 2004). Nutrition during pregnancy influences both hyperplastic and hypertrophic processes and has profound effects on the final result.

Muscle development in the fetus has low priority in the nutrient partitioning compared to other organs (Zhu *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2010a, 2015), and in nutrient restriction, muscle is more vulnerable than other organs (Zhu *et al.*, 2006). The effect of maternal subnutrition on muscle development depends on the stage of pregnancy the restriction occurs (Fahey *et al.*, 2005b; Du *et al.*, 2010a). Nutrient restrictions around 50% of requirements from 28 to 78 or from 30 to 70 days of gestation in ewes, decrease the total number of secondary muscle fibers and the ratio secondary fibers/primary fibers (Zhu *et al.*, 2004; Fahey *et al.*, 2005b). However, nutrient restrictions applied during mid to late pregnancy (85 to 115 days of gestation) tended to decrease muscle mass but not the number of fibers, and did not affect muscle composition (Fahey *et al.*, 2005b). The decrease in muscle mass in the newborn lamb could have negative and irreversible long-term consequences on the future performance of the adult animal (Stannard y Johnson, 2003).

In temperate or subtropical countries, with pastoral systems based on natural grasslands (Allen *et al.*, 2011), the seasonality of the quantity and quality of the natural grassland (Carámbula, 1991; Berretta *et al.*, 1994; Bermúdez and Ayala, 2005; Formoso, 2005) is a limiting factor in sheep production farms. The period of lowest forage production occurs in winter, which coincides with the gestation of the ewe and increased maternal requirements due to the demands of the growing fetus. Forage allowance is a key grazing management factor for the best use of pasture; it combines stocking rate and pasture characteristics (Sollenberger *et al.*, 2005). In the

present work, it was hypothesized that a low forage allowance of natural grassland from 23 days before conception to either 70 or 122 days of pregnancy, affects growth and muscle development in both the fetus and the newborn lamb. The aim of this work was to evaluate the effect of two forage allowances to ewes grazing natural grassland, since 23 days before conception to either 70 or 122 days of pregnancy, on growth and development of the *Longissimus lumborum* and *Semitendinosus* muscles in both their fetuses and newborn lambs.

3.3. MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out at the Estación Experimental Bernardo Rosengurtt of the Facultad de Agronomía, Universidad de la República (UdelaR), Uruguay (32° S, 54° W) since autumn (March) until spring (September) 2013. All procedures on animals were conducted according to the experimental protocols approved by the Animal Experimental Committee of the UdelaR (Comité de ética en el uso de animales).

Animals, treatments and experimental design

Thirty two ha of natural grassland were divided into three blocks separated in two by electrical fences, and the topography was considered, so there were three plots/treatment. Grazing was continuous and the animals had free access to water throughout the experiment.

In total, 335 Corriedale, multiparous ewes without lambs, with live weight (LW) = 48.9 ± 0.3 kg and body condition score (BCS, scale 1 = emaciated – 5 = obese; Jefferies, 1961) = 2.74 ± 0.02 units at the beginning of the experiment were used in a complete randomized block design. The ewes were randomly assigned, and their LW and BCS considered, to two treatments, in march (breeding season), 23 days before artificial insemination (AI). The treatments were: i) High forage allowance (HFA; n = 178): these ewes grazed on natural grassland at 2.9 (march-june) - 3.8 (july) kg dry matter (DM) /kg of LW; ii) Low forage allowance (LFA; n = 157): these ewes grazed on the same three blocks of natural grassland but at 1.4 (march-june) - 2.6 (july) kg DM /kg of LW (Sollenberger *et al.*, 2005). Forage

allowances were adjusted monthly based on kg DM/ha on each plot, as determined by the double sampling method (Haydock and Shaw, 1975), forage height and on ewes LW. Ewes from the same flock, category and physiological status but not belonging to the experiment, were included or removed (put-and-take animals) to adjust the stocking rate as necessary.

Estrus was synchronized using two doses (10 mg) of a prostaglandin analogue (Dinoprost tromethamine, Lutalyse, Pfizer, Kalamazoo, MI, USA) given 10 days apart. The ewes were inseminated pericervically using fresh semen from 3 Corriedale rams, 12 h after estrus detection (day 0). Pregnancy and number of fetuses were determined using transrectal ultrasound at 30 days after AI and non pregnant ewes were eliminated from the experiment. Sixty days after AI, pregnancy and number of fetuses were confirmed and the sex of the single fetuses was determined, by transrectal ultrasound. At day 70 of pregnancy, 18 ewes (9/treatment, three/plot) carrying single male fetus were euthanized using a captive bolt pistol followed by immediate exsanguination, and the gravid uterus was removed.

Surviving ewes remained on the same forage allowances until 121-122 days of pregnancy, when they were shorn. After shearing, all ewes grazed as a single mob on *Festuca arundinacea* at 2.8 kg DM/kg LW until 2 days before lambing began. From 5 days before shearing until lambing, all the ewes were supplemented with 200 g/ewe.day of rice bran and 50 mL of crude glycerin/ewe.day (77% of glycerol). Two days before lambing, all ewes grazed natural grassland *ad libitum* in small paddocks, where they continued to be supplemented, and continuously monitored until lambing (Freitas-de-Melo *et al.*, 2015). The first 18 (9/treatment, 3/plot) single, male newborn lambs were euthanized using i.v. tiopental (Novartis, Uruguay), 12 h after birth.

The availability of forage and the chemical composition of forage, rice bran and glycerine, as well as further details of the procedures were reported in chapter 2.

Records, sampling and measurements in the ewes

Both LW and BCS were recorded in the ewes euthanatized at 70 days of pregnancy on days -23 (beginning of treatments), 0 (day of AI), 24, 58 and previous to sacrifice (day 70), and in the 18 mothers of the newborn lambs, on days -23, 0, 24,

58, 96, 122 (end of treatments), and 145 (2 days before lambing) of pregnancy. All records were registered in the morning.

Blood samples (8 mL) were taken from the mothers by venipuncture of the jugular vein using tubes with heparin, at the beginning of the experiment (day -23) and before euthanasia (day 70). The mothers of the newborn lambs were sampled at days -23, 122 and 145 of pregnancy using the same procedure. All samples were centrifuged (3000 x g, 10 min) within the first hour after collection, and plasma was recovered and stored at -20°C until concentrations of insulin and insulin growth factor type I (IGF-I) were determined. Plasma concentrations of insulin and IGF-I were quantified using an IRMA assay (Diasource Immuno Assays S.A, Nivelles, Belgium), and a RIA commercial kit (RIACT Cis Bio International, GIF Sur Yvette Cedex, France), respectively. All samples were processed in only one assay. The sensitivity of the insulin assay was 1.0 μ IU/mL, the intra assay coefficient of variation for the low control (17.5 μ IU/mL) and high control (101.5 μ IU/mL) was 1% and 10%, respectively. The sensitivity of the IGF-I assay was 0.7 ng/mL, and the intra assay coefficient of variation for the low control (40.6 ng/mL) was 4.3%.

Records, sampling and determinations in 70-days fetuses and newborn lambs

Fetuses were weighted and the muscles of the lumbar and left leg regions were dissected. One sample was fixed in Bouin solution and used for histological determinations, and another sample was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until total RNA was isolated. Before euthanasia, the 18 newborn lambs were weighed and a blood sample (3 mL) was taken by venipuncture of the jugular vein using tubes with heparin, and then processed as already described above. *Semitendinosus* (ST) and *Longissimus lumborum* (LL) muscles were dissected, and samples for histological and molecular studies were taken in a similar way as described for fetuses.

Plasma non-esterified fatty acids (NEFA), glucose, albumin, urea, cholesterol, and total protein plasma concentrations were determined spectrophotometrically using commercial kits (Wako NEFA, Wako Chemical, Richmond, USA, glucose oxidase/peroxidase, albumin Bromocresol Green, urea Ureasa/Salicilato, cholesterol

oxidase/oxidase, total protein Biuret, BioSystems S.A., Barcelona, Spain; respectively) with volume of samples and reagents adjusted to a 96-well microplate and read in a Multiskan EX (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). All samples were determined in the same assay for each metabolite. The sensitivity was 0.01 mmol/L, 0.01 mmol/L, 4.60 g/L, 1.10 g/L, 0.22 mmol/L and 0.04 mmol/L for glucose, cholesterol, total protein, albumin, urea and NEFA assays, respectively. The intra-assay CV values for low and high controls were not greater than 4.9 and 9.6%; respectively. Plasma concentrations of insulin and IGF-I, in lambs and ewes, were determined in a single assay.

Histological examinations

Samples were embedded in paraffin wax through standard histological techniques. Sections were obtained from the center of each sample (6 µm thick, microtome model 2030 Reichert-Jung, MIN, USA). Samples (1 sample/muscle.animal) were stained with haematoxylin-eosin to evaluate muscle morphology (Bayol *et al.*, 2004). Muscle fascicle density in fetuses, fiber density in lambs and the proportion of muscle and non muscle tissues were estimated from 5 microscope fields/muscle.animal. Fascicle diameter in fetuses and fiber diameter in lambs was calculated as the mean from 30 transversal fascicle or fiber sections. The number of nuclei/muscle fascicle in fetuses or fiber in lambs was calculated as the mean from all transversal fiber sections in 5 microscope fields/muscle.animal. All histological variables were measured in an image analysis system (400x, light microscope Olympus BX50, videocamera, software Infinity analyze).

RNA DNA and Protein concentration

Total RNA from muscle samples was isolated using TRIzol (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA, USA) and isolation of DNA was performed using the high salt protocol (Sunnucks and Hales, 1996). Concentrations of RNA and DNA were determined by measuring absorbance at 260 nm (NanoDrop ND-100 Spectrophotometer Nanodrop Technnologies, Inc., Wilmington, DE, EEUU). The purity and integrity of the isolated RNA and DNA were assessed from 260/280 nm

(> 1,8) and 260/230 nm (> 1,9) absorbance ratios and by electrophoresis in 1% agarose gel. Total protein concentration (PR) in tissue was determined with Coomassie Blue G (Bradford, 1976), with bovine serum albumin (Fraction V, Sigma Chemical, St. Louis, MO) as the standard (Johnson *et al.*, 1997). Tissue samples were homogenized in PBS and were analyzed with a micro plate spectrophotometer (Multiskan EX Thermo Scientific) and were assessed against concentration curves of known standards.

In muscle samples from 70-days fetuses, only RNA concentration was determined, due to small sample sizes.

Statistical analyses

Data were analyzed in a completely randomized block design (by topography) using the SAS Systems programs (SAS 9.0V; SAS Institute, Cary, NC, USA). Two treatments were applied (high and low forage allowance) in three blocks and six plots (3 plots by treatment). Data of plasma hormone concentrations of the ewe were analyzed as repeated measures using the MIXED procedure (PROC MIXED) with day of pregnancy as the repeated effect. The model included the forage allowance, day of pregnancy and their interactions as fixed effects and the block as the random effect. Initial values (day -23) were used as covariate in the data analysis model. Data of weight and plasma concentration of metabolites, hormones, muscle fascicle or fiber density and diameter, number of nuclei/muscle fascicle or fiber, muscle and non muscle tissue proportion, RNA, DNA and PR concentration in the muscles were analyzed using a mixed model (PROC MIXED). The adjusted models included forage allowance (high vs low) as fixed effects and the block as the random effect. The interaction between forage allowance and block was included in the model as a random effect, when the covariance parameter estimate was zero or near to zero it was removed from the model. Concentration of metabolites and hormones were also analyzed using the birth weight as covariate to study if the changes were a reflection of the birth weight. In Results the data of the analysis without the covariate are presented in tables, when the covariate changed the result of the first analysis, the information is described in text. Pearson correlations (PROC CORR) were studied

between the variables. Data are expressed as least square means \pm standard errors. For all results, means were considered to differ when $P \leq 0.05$, and trends were identified when $0.05 < P \leq 0.10$.

3.4. RESULTS

Live weight, body condition score and plasma concentration of hormones in ewes

At slaughter, the HFA mothers of 70-days fetuses weighed more ($P = 0.01$), and had higher ($P = 0.0001$) BCS than those of LFA group. The HFA mothers of newborn lambs were heavier ($P = 0.001$) and had higher ($P = 0.001$) BCS since the first month of treatment. Despite the increase in the nutritional plane after shearing, HFA ewes remained heavier ($P < 0.05$) and showed higher ($P < 0.05$) BCS, 2 days before lambing, than LFA ewes. In chapter 2 it was reported further details regarding LW and BCS changes of the ewes.

Plasma concentration of insulin tended ($P = 0.1$) to be higher in the HFA mothers of fetuses ($16.90 \pm 2.8 \mu\text{IU/mL}$) than in LFA ewes ($9.10 \pm 3.1 \mu\text{IU/mL}$). Days of pregnancy did not influence ($P = 0.44$) the concentration of insulin, but there was a trend ($P = 0.1$) to have higher ($P < 0.05$) insulin concentration in HFA ewes at the time of sacrifice than LFA group. On the other hand, plasma concentration of IGF-I was not affected neither by forage allowance (HFA: $113.25 \pm 9.5 \text{ ng/mL}$ vs LFA: $113.43 \pm 9.1 \text{ ng/mL}$; $P = 0.99$), nor by day of pregnancy ($P = 0.37$) or the interaction forage allowance and day of pregnancy ($P = 0.14$).

Forage allowance influenced the plasma concentration of insulin (HFA: $12.78 \pm 1.00 \mu\text{IU/mL}$ vs LFA: $8.61 \pm 1.44 \mu\text{IU/mL}$; $P = 0.05$) and IGF-I (HFA: $253.01 \pm 20.78 \text{ ng/mL}$ vs LFA: $161.42 \pm 24.98 \text{ ng/mL}$, $P = 0.04$) of the mothers of the newborn lambs. The plasma concentration of both hormones also was affected by the day of pregnancy ($P < 0.001$). The interaction forage allowance and day of pregnancy affected ($P = 0.05$) the concentration of insulin, and tended ($P = 0.1$) to influence the concentration of IGF-I. Ewes of HFA group showed greater ($P < 0.05$) concentration of insulin at day 122 ($11.67 \pm 1.35 \mu\text{IU/mL}$) and 145 ($19.33 \pm 1.31 \mu\text{IU/mL}$) of pregnancy than those of LFA group (day 122: $6.68 \pm 1.85 \mu\text{IU/mL}$ and day 145: $12.08 \pm 1.85 \mu\text{IU/mL}$). However, plasma concentration of IGF-I was

greater ($P < 0.05$) at day 145 of gestation in ewes of HFA group (370.23 ± 33.81 ng/mL) than in LFA ewes (198.91 ± 40.19 ng/mL). In both groups, the plasma concentration of insulin and IGF-I increased ($P < 0.05$) during the period ewes grazed on the Festuca prairie.

Fetal weight, birth weight and plasma concentration of metabolites and hormones in newborn lambs.

Fetal weight tended ($P = 0.08$) to be higher in HFA than in LFA group (HFA: 151.3 ± 5.2 g vs LFA: 143.9 ± 5.1 g), and HFA newborn lambs were heavier ($P = 0.008$) than those from LFA (HFA: 5.1 ± 0.1 kg vs LFA: 4.5 ± 0.1 kg). Complete information was reported in chapter 2. Despite the arithmetic differences observed in plasma concentrations of glucose, albumin and insulin between HFA and LFA lambs (table 1), such differences did not reach the level of significance. Forage allowance did not affect the metabolite or hormone concentrations (Table 1). When birth weight was included in the model as a covariate, metabolite and hormone concentrations were not different either ($P \geq 0.12$).

Table 1. Plasma glucose, cholesterol, NEFA, total protein, albumin, urea, insulin and IGF-I concentrations in newborn lambs, whose mothers were offered 2.9-3.8 kg dry matter (DM)/kg live weight (LW) or 1.4-2.6 kg DM/kg LW of natural grassland since 23 days before conception until 122 days of gestation. Data are expressed as ls means \pm SE.

Metabolites and hormones	HFA	LFA	P-value
Glucose (mmol/L)	4.6 ± 0.7	3.0 ± 0.9	0.14
Cholesterol (mmol/L)	1.9 ± 0.2	1.7 ± 0.3	0.65
NEFA (mmol/L)	1.8 ± 0.2	1.40 ± 0.2	0.25
Total protein (g/L)	74.8 ± 8.8	83.4 ± 11.1	0.47
Albumin (g/L)	29.9 ± 2.9	23.8 ± 3.6	0.15
Urea (mmol/L)	10.8 ± 0.9	11.2 ± 1.3	0.82
Insulin (μIU/mL)	10.2 ± 2.3	4.7 ± 2.4	0.12
IGF-I (ng/mL)	271.7 ± 36.8	248.9 ± 43.5	0.70

Histological analyses of 70-days fetuses and newborn lambs

Forage allowance affected ($P \leq 0.007$) LL and ST muscle fascicle diameter, number of nuclei/fascicle and muscle tissue proportion in 70-day fetuses; HFA fetuses showed greater values than LFA group in both muscles. Non-muscle tissue proportion (adipose and connective tissue) was higher ($P \leq 0.007$) in LFA than in HFA fetuses in both muscles. However, the muscle fascicle density of ST and LL muscles was not affected ($P \geq 0.46$) by forage allowance (Table 2).

Table 2. Histological variables of *Longissimus lumborum* (LL) and *Semitendinosus* (ST) muscle in 70-days fetuses whose mothers were offered 2.9-3.8 kg dry matter (DM)/kg live weight (LW) or 1.4-2.6 kg DM/kg LW of natural grassland since 23 days before conception. Data are expressed as ls means \pm SE.

	LL		
	HFA	LFA	P-value
Muscle fascicle diameter (μ)	62.3 \pm 4.0	44.6 \pm 3.9	0.001
Fascicle density/ μm^2 ($\times 10^{-4}$)	0.85 \pm 0.06	0.90 \pm 0.06	0.46
N $^{\circ}$ nuclei/fascicle	11.8 \pm 0.70	7.4 \pm 0.7	0.0004
Muscle tissue (%)	32.6 \pm 2.0	25.7 \pm 2.0	0.0025
Non-muscle Tissue (%)	67.4 \pm 2.0	74.3 \pm 2.0	0.0025
	ST		
	HFA	LFA	P-value
Muscle fascicle diameter (μ)	64.1 \pm 3.0	40.5 \pm 3.0	<0.0001
Fascicle density/ μm^2 ($\times 10^{-4}$)	1.76 \pm 0.1	1.71 \pm 0.1	0.82
N $^{\circ}$ nuclei/fascicle	9.9 \pm 0.40	5.9 \pm 0.40	<0.0001
Muscle tissue (%)	48.2 \pm 3.4	33.1 \pm 3.4	0.007
Non-muscle tissue (%)	51.8 \pm 3.4	66.9 \pm 3.4	0.007

Forage allowance affected LL and ST fiber diameter, nuclei number/fiber and muscle tissue proportion of newborn lambs ($P < 0.03$); HFA group showed greater values than LFA lambs. On the other hand, non-muscle tissue was greater ($P < 0.03$) in LFA newborn lambs than in HFA group. Forage allowance also affected ($P =$

0.005) fiber density of LL muscle and a trend was found in ST muscle ($P = 0.09$, Table 3).

Table 3. Histological variables of *Longissimus lumborum* (LL) and *Semitendinosus* (ST) muscle in newborn lambs whose mothers were offered 2.9-3.8 kg dry matter (DM)/kg live weight (LW) or 1.4-2.6 kg DM/kg LW of natural grassland since 23 days before conception until 122 days of gestation. Data are expressed as ls means \pm SE.

	LL		
	HFA	LFA	P-value
Diameter (μ)	29.82 \pm 0.97	20.85 \pm 0.97	<0.0001
Fiber density/ μm^2 ($\times 10^{-4}$)	4.05 \pm 0.2	3.12 \pm 0.2	0.005
N° nuclei/Fiber	1.76 \pm 0.07	1.26 \pm 0.07	<0.0001
Muscle tissue (%)	42.27 \pm 1.90	32.24 \pm 1.90	0.002
Non-muscle tissue (%)	57.73 \pm 1.90	67.76 \pm 1.90	0.002
	ST		
	HFA	LFA	P-value
Diameter (μ)	25.1 \pm 0.8	21.3 \pm 0.8	0.0058
Fiber density/ μm^2 ($\times 10^{-4}$)	4.6 \pm 0.35	3.7 \pm 0.37	0.09
N° nuclei/Fiber	1.30 \pm 0.02	1.09 \pm 0.02	<0.0001
Muscle tissue (%)	53.3 \pm 2.8	43.4 \pm 2.8	0.025
Non-muscle tissue (%)	46.7 \pm 2.8	56.6 \pm 2.8	0.025

RNA, DNA and PR concentration in newborn lambs and RNA concentration in 70-days fetuses

Forage allowance affected ($P = 0.02$) RNA concentration of ST muscle in 70-days fetuses; ST muscle of HFA group showed more RNA concentration (0.64 \pm 0.06 mg) than LFA fetuses (0.40 \pm 0.06 mg). However, forage allowance did not affect ($P = 0.69$) RNA concentration of LL muscle of 70-day fetuses (HFA: 0.61 \pm 0.07 mg vs LFA: 0.57 \pm 0.07 mg).

Forage allowance did not affect RNA concentration nor PR/RNA ratio ($P > 0.58$) of LL and ST muscles in newborn lambs. Protein concentration of LL muscle was not affected ($P = 0.53$) by forage allowance, however the PR concentration of ST muscle was greater ($P = 0.01$) in HFA than in LFA newborn lambs. Forage allowance affected ($P < 0.04$) DNA concentration and PR/DNA ratio in both muscles. Newborn lambs from HFA group showed greater DNA concentration and lower PR/DNA ratio in both muscles than LFA group (Table 4).

Table 4. Molecular variables of *Longissimus lumborum* (LL) and *Semitendinosus* (ST) muscle in newborn lambs whose mothers were offered 2.9-3.8 kg dry matter (DM)/kg live weight (LW) or 1.4-2.6 kg DM/kg LW of natural grassland since 23 days before conception until 122 days of gestation. Data are expressed as ls means \pm SE.

	LL		
	HFA	LFA	P-value
RNA (mg/g tissue)	1.03 \pm 0.08	1.09 \pm 0.08	0.58
DNA (mg/g tissue)	4.5 \pm 0.25	3.5 \pm 0.26	0.02
PR (mg/g tissue)*	198.8 \pm 5.1	203.8 \pm 5.8	0.53
PR/RNA	200.2 \pm 23.2	201.3 \pm 25.1	0.88
PR/DNA	45.5 \pm 4.7	61.7 \pm 5.4	0.04
	ST		
	HFA	LFA	P-value
RNA (mg/g tissue)	0.99 \pm 0.09	0.98 \pm 0.09	0.91
DNA (mg/g tissue)	4.6 \pm 0.32	3.0 \pm 0.30	0.004
PR (mg/g tissue)*	204.9 \pm 3.3	191.2 \pm 3.5	0.01
PR/RNA	213.9 \pm 21.3	203.0 \pm 24.1	0.74
PR/DNA	46.7 \pm 5.4	68.9 \pm 5.8	0.02

*PR= Protein concentration

3.5. DISCUSSION

As expected, low forage allowance of natural grassland in ewes from 23 days before conception until 70 or 122 days of pregnancy affected LW and BCS in the ewes of LFA group, and in a worse energy balance suggested by the lower plasma concentration of insulin and IGF-I of the LFA group as compared to HFA. Plasma concentrations of these hormones are indicative of the energy availability and metabolic status of the animal (Chilliard *et al.*, 2005; Fernández-Foren *et al.*, 2011; Astessiano *et al.*, 2011, 2013).

During pregnancy, due to the increasing fetus demands, the mother must readjust its metabolism to prioritize the fetal development and growth (Ehrhardt *et al.*, 2001). The control of metabolism of the females during pregnancy involves primarily the homeorhetic control, in order to prioritize the gravid uterus in the nutrient partitioning during this period (Bauman and Curie, 1980). Nutritional restriction during pregnancy determines a partition of nutrients even more severe for both mother and fetus, and the peripheral organs are even less prioritized (Zhu *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2010 a). When the readjustment in the metabolism of the pregnant mother is not sufficient to compensate the nutrient restriction, the fetus suffers IUGR (Gluckman y Pinal, 2003; Wu *et al.*, 2006; Gardner *et al.*, 2007; Morrison, 2008). In the present work, a low forage allowance of natural grassland decreased plasma concentration of insulin on 70 and 145 days of pregnancy and IGF-I on day 145. The difference in maternal nutrient intake of both groups reduced the birth weight of the newborn lamb approximately 11%. LFA newborn lambs also presented lower weight of several organs (liver, adrenals, kidneys, testicles; chapter 2) and weaker development of the LL and ST muscles.

Nutrition during ovine pregnancy influences the concentration of metabolites and metabolic hormones in the offspring (Pérez-Clariget *et al.*, 2003; Kenyon *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2013). The absence of statistical differences in the plasma concentration of glucose and insulin in the newborn lambs could be explained, at least in part, not only by the number of animals used, but also by the drastic increase in the plane of nutrition that the ewes received 3 weeks before lambing. This change in the nutrient intake of the mothers could have induced an increase in the variability

of the plasma concentrations of the metabolites and hormones that could have masked the expression of possible differences between treatments.

Nutritional status in ewes influences the growth hormone (GH)-IGF-I system in both mother and fetus (Bauer *et al.*, 1995). An increase in the plane of nutrition during pregnancy, increases the plasma concentration of IGF-I, stimulating myoblasts proliferation and delaying cellular differentiation; the final result is an increase in the number of muscle fibers (Tollefsen *et al.*, 1989; Brameld *et al.*, 2003; Oksbjerg *et al.*, 2004). On the other hand, a nutritional restriction during pregnancy would result in an increase in the plasma concentrations of GH and a decrease in IGF-I in both mothers and their fetuses (Bauer *et al.*, 1995). Intrauterine subnutrition reduces plasma concentration of glucose, insulin and IGF-I in newborn lambs (Pérez-Clariget *et al.*, 2003), and the density of muscle fibers (Tollefsen *et al.*, 1989; Brameld *et al.*, 2003; Oksbjerg *et al.*, 2004). In the present work, plasma concentration of IGF-I was lower in LFA ewes than in HFA, however no difference was found in their newborn lambs. Although, fiber density in LL muscle was reduced and a trend was found in ST muscle to have lower fiber density in LFA newborn lambs.

Plasma concentration of hormones and LW in ewes responded faster to nutritional changes during the last 3 weeks before lambing than BCS. However, despite the increase in the plane of nutrition during this period, HFA ewes were heavier, had greater BCS and plasma concentration of insulin and IGF-I at 145 days of pregnancy, and newborn lambs had greater birth weight and muscle development as compared to LFA animals. The increase in the plane of nutrition during 3 weeks before lambing did not compensate the previous difference in forage allowance of natural grassland to which ewes were subjected.

The fetal stage is critical for muscle development due to the low priority in nutrient partitioning of skeletal muscle during intrauterine life (Zhu *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2010 a). LFA newborn lambs had lighter carcass than HFA (chapter 2). Considering that bones and muscles are the main components of the carcass, our present findings indicate that the low forage allowance produced subnutrition in pregnant ewes inducing an intrauterine environment that affected muscle

development. In the present study, the subnutrition suffered during intrauterine life, reduced muscle development prematurely (70 days), and when the subnutrition lasted until 122 days of pregnancy, these effects were more profound. Muscle development seems to lose priority as the subnutrition extends during the pregnancy.

It has been suggested that there is a competitive relationship between myogenesis, adipogenesis and fibrogenesis during embryonic life, since all these cell lines are derived from the same mesenchymal cells (Du *et al.*, 2015). Subnutrition would limit myogenesis, favoring the other two processes (Zhu *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2010a, 2010b), which is in agreement with the lower proportion of muscle tissue and higher proportion of non-muscle tissue (adipose and connective tissue) in LFA fetuses and newborn lambs observed in the present work.

The period of pregnancy in which the mother suffers subnutrition is critical to understand the response of the fetal muscle. In sheep, it would seem that the proliferation of muscle cells occurs prior to day 85, when the majority of muscle fibers are already formed, and the differentiation begins around that day (Fahey *et al.*, 2005a). A nutritional restriction during early pregnancy would affect muscular hyperplasia, in other words, the number of fibers. In this way, nutritional restriction affects muscle development, and limits the future capacity of hypertrophy of the organ, a process that, in the fetus, continues to the period of cell proliferation. On the other hand, the effect of a nutritional restriction in mid-late pregnancy (after day 85) would limit the hypertrophy of the organ, decreasing the size but not the number of fibers (Fahey *et al.*, 2005a) and producing lighter muscles (effect on muscle growth).

In the present work, no differences in the muscle fascicle density of LL and ST muscles in 70-days fetuses were observed although a difference in muscle fascicle diameter was found. It should be noted that the differences in LW and BCS between both treatments in ewes were recently found from day 58 of pregnancy. Besides, in the fetuses of 70 days no difference was observed in the carcass weight (chapter 2). In contrast, differences in LW and BCS in the mothers of the newborn lambs were found from day 24 of pregnancy, which could explain that fiber density in LL and ST muscle of LFA lambs were lower than in HFA. Probably, the early pregnancy nutritional restriction in LFA newborn lambs affected cell proliferation processes.

Lambs birth weight could affect the muscle growth during postnatal life, determining that lighter lambs at birth do not achieve the same muscle mass than the heavier ones. This effect would be mediated by the number of nuclei per fiber and muscle DNA concentration, rather than by the number of the muscle fibers (Beermann, 1983; Greenwood *et al.*, 2000). The DNA concentration is used to estimate the number of cells (hyperplasia), but in muscle tissue, as muscle fibers are multinucleated, it is related to the number of nuclei. In our work, it was observed that LFA decreased the number of nuclei per muscle fascicle in fetuses or fiber in lambs and DNA concentration in both muscles, so it is possible to think that these animals would have compromised their muscle growth in postnatal life and their future productive performance.

The concentration of RNA is considered an indicator of cellular metabolic activity and of the ability of protein synthesis (Sainz y Bentley, 1997; Noziere *et al.*, 1999). The lower RNA concentration in ST muscle (related to movement) in 70-days fetuses could suggest that in ST muscle the LFA affected prematurely cell growth. However, LL muscle (related to posture) seemed to be prioritized, in early pregnancy, compared to the ST muscle, because there was no effect of treatments in RNA concentration. Considering that the PR concentration is an indicator of the cell size (Sainz y Bentley, 1997; Noziere *et al.*, 1999), it is possible that the intrauterine subnutrition suffered by LFA lambs affected the size of ST but not the LL muscle, as suggested by the lower PR concentration observed in ST compared with LL. However, the diameter of the muscle fascicle or fiber, an indicator of the hypertrophy process, was lower in both muscles, either in LFA fetuses and newborn lambs. The PR/DNA ratio, called “DNA unit” has been used as an indicator of growth and muscle volume (hypertrophy, Cheek, 1985). In both muscles, PR/DNA ratio was higher in LFA lambs as compared to HFA, in agreement with the lower number of nuclei observed. On the other hand, the concentration of RNA or the PR/RNA ratio, an indicator of ribosomal capacity (Noziere *et al.*, 1999) of both muscles, was not affected by treatments.

3.6. CONCLUSIONS

The results of the present study indicate that forage allowance of natural grassland of 1.4 to 2.6 kg of dry matter/kg LW from 23 days before conception until day 70 or 122 of gestation induced subnutrition during pregnancy that affects negatively the fetal development of LL and ST muscles. This effect is evident in 70-days fetuses, but when the nutritional restriction extends until day 122 of pregnancy, the effects become more severe. Taken together, our present findings suggest that LFA lambs have less potential ability than HFA lambs, to reach similar muscle volume in adult life, independently of posnatal nutrition, with consequences in the future productive performance.

3.7. ACKNOWLEDGMENTS

The authors thanks the staff of the Experimental Station Bernardo Rosengurt: Ing. Agrs. Carlos Mantero (Director), Eduardo Lena and Xenia Vieira (Head of operations) and Ignacio Sosa, Carlos García and Baltazar Martínez for animal care and assistance throughout the field study. To Dr. Carlos López Mazz and Mariel Regueiro for ultrasound work. To Drs. Álvaro López, Patricia Genovese y Victoria Riaño for their help during the field work and Mónica Viqueira for her help during the lab work. And to the Lab of Faculty of Agronomy and Veterinary (UdelaR). The first author had a fellowship (POS_NAC_2012_1_9235) from Research and Innovation National Agency (ANII, Montevideo, Uruguay).

3.8. REFERENCES

- Allen VG, Batello C, Berretta EJ, Hodgson J, Kothmann M, Li X, Mclvor J, Milne J, Morris M, Peeters A, Sanderson M (2011) An international terminology for grazing lands and grazing animals. *Grass and Forage Science* **66**, 2-68.
- Astessiano AL, Pérez-Clariget R, Quintans G, Soca P, Carriquiry M (2011) Effects of a short-term increase in the nutritional plane before the mating period on metabolic and endocrine parameters, hepatic gene expression and reproduction in primiparous beef cows on grazing conditions. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **96**, 535-544.

- Astessiano AL, Pérez-Clariget R, Espasandín AC, López-Mazz C, Soca P, Carriquiry M (2013) Metabolic, productive and reproductive responses to postpartum short-term supplementation in primiparous beef cows. *Revista Brasileira de Zootecnia* **42**, 246-253.
- Bauer MK, Breier BH, Harding JE, Veldhuiss JD, Gluckman PD (1995) The fetal somatotrophic axis during long term maternal undernutrition in sheep: Evidence for nutritional regulation in utero. *Endocrinology* **136**, 1250-1257.
- Bauman D, Curie B (1980) Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science* **63**, 1514–1529.
- Bayol S, Jones D, Goldspink G, Stickland NC (2004) The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. *British Journal of Nutrition* **91**, 331–339.
- Beermann DH (1983) Effects of maternal dietary restriction during gestation and lactation, muscle, sex and age on various indices of skeletal muscle growth in the rat. *Journal of Animal Science* **57**, 328–337.
- Bermúdez R, Ayala W (2005) Producción de forraje de un campo natural de la zona de lomadas del este. Seminario de actualización técnica en manejo de campo natural. INIA Serie Técnica **151**, 33-40.
- Berretta EJ, San Julián R, Montossi F, Silva JA (1994) Natural pastures and sheep production in the Basaltic region in Uruguay. In 'Proceedings of the IVth World merino Conference'. pp. 245-262. (Montevideo. SUL)
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brameld JM, Fahey AJ, Langley-Evans SC, Buttery PJ (2003) Nutritional and hormonal control of muscle growth and fat deposition. *Archiv Tierzucht, Dummerstorf* **46**, 143-156.
- Carámbula M (1991) Aspectos relevantes para la producción forrajera. Montevideo, INIA. Serie Técnica **19**, 49.

- Cheek DB (1985) The control of cell mass and replication. The DNA unit - a personal 20-year study. *Early Human Development* **12**, 211-239.
- Chilliard Y, Delavaud C, Bonnet M (2005) Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domestic Animal Endocrinology* **29**, 3-22.
- Du M, Tong J, Zhao JX, Underwood KR, Zhu MJ, Ford SP, Nathanielsz PW (2010a) Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *Journal of Animal Science* **88**, 51-60.
- Du M, Yan X, Tong JF, Zhao J, Zhu MJ (2010b) Maternal obesity, inflammation, and fetal skeletal muscle development. *Biology of Reproduction* **82**, 4-12.
- Du M, Wang B, Fu X, Yang Q, Zhu MJ (2015) Review: Fetal programming in meat production. *Meat Science* **109**, 40-47.
- Ehrhardt RA, Slepatis RM, Bell AW, Boisclair YR (2001) Maternal leptin is elevated during pregnancy in sheep. *Domestic Animal Endocrinology* **21**, 85 - 96.
- Fahey AJ, Brameld JM, Parr T, Buttery PJ (2005a) Ontogeny of factors associated with proliferation and differentiation of muscle in the ovine fetus. *Journal of Animal Science* **83**, 2330-2338.
- Fahey AJ, Brameld JM, Parr T, Buttery PJ (2005b) The effect of maternal undernutrition before muscle differentiation on the muscle fiber development of the newborn lamb. *Journal of Animal Science* **83**, 2564-2571.
- Fernández-Foren A, Abecia JA, Vázquez MI, Forcada F, Sartore I, Carriquiry M, Meikle A, Sosa C (2011) Restricción alimenticia en ovinos: respuesta endocrino-metabólica dependiente de las reservas corporales. *ITEA* **107**, 257-271.
- Formoso D (2005) La investigación en utilización de pasturas naturales sobre Cristalino desarrollada por el Secretariado Uruguayo de la Lana. INIA, Serie Técnica **151**, 51-59.
- Freitas-de-Melo A, Ungerfeld R, Hötzel MJ, Abud MJ, Alvarez-Oxiley A, Orihuela A, Damián JP, Pérez-Clariget R (2015) Mother-young behaviours at lambing in grazing ewes: Effects of lamb sex and food restriction in pregnancy. *Applied Animal Behaviour Science* **168**, 31-36.

- Gao F, Liu YC, Hou XZ (2013) Effect of maternal undernutrition during late pregnancy on hormonal status and metabolic changes in neonatal lambs. *Czech Journal of Animal Science* **58**, 15–20.
- Gardner DS, Buttery PJ, Daniel Z, Symonds ME (2007) Factors affecting birth weight in sheep: maternal environment. *Reproduction* **133**, 297–307.
- Gluckman PD, Pinal CS (2003) Regulation of fetal growth by the somatotrophic axis. *Journal of Nutrition* **133**, 1741–1746.
- Greenwood PL, Hunt AS, Hermanson JW, Bell AW (2000) Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: II. Skeletal muscle growth and development. *Journal of Animal Science* **78**, 50–61.
- Haydock KP, Shaw NH (1975) The comparative yield method for estimating dry matter yield of pastures. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* **5**, 663-670.
- Jefferies BC (1961) Body condition scoring and its use in management. *Tasmanian Journal of Agriculture* **32**, 19-21.
- Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP (1997) Uterine growth, cell proliferation, and c-fos proto-oncogene expression throughout the estrous cycle in ewes. *Biology of reproduction* **56** (2), 393-401.
- Kenyon PR, Van Der Linden DS, Blair HT, Morris ST, Jenkinson CMC, Peterson SW, Mackenzie DDS, Firth EC (2011) Effects of dam size and nutritional plane during pregnancy on lamb performance to weaning. *Small Ruminants Research* **97**, 21-27.
- Morrison JL (2008). Sheep models of intrauterine growth restriction: Fetal adaptations and consequences. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **35**, 730–743.
- Noziere P, Attaix D, Bocquier F, Doreau M (1999) Effects of underfeeding and refeeding on weight and cellularity of splanchnic organs in ewes. *Journal of Animal Science* **77**, 2279–2290.
- Oksbjerg N, Gondret F, Vestergaard M (2004) Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the

- insulin-like growth factor (IGF) system. *Domestic Animal Endocrinology* **27**, 219-240.
- Pérez-Clariget R, Banchero G, López A, Blackberry MA, Blache D, Milton JTB, Martin GB (2003) A low energy diet fed to pregnant ewes affects the metabolism of the ewes and their lambs. In 'Proceedings of the IXth World conference on Animal Production'. pp. 264. (Porto Alegre. Brazil)
- Rhind SM, Rae MT, Brooks AN (2001) Effects of nutrition and environment factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* **122**, 205-214.
- Sainz RD, Bentley BE (1997) Visceral Organ Mass and Cellularity in Growth-Restricted and Refed Beef Steers. *Journal of Animal Science* **75**, 1229–1236.
- Sollenberger LE, Moore JE, Allen VG, Pedreira CGS (2005) Reporting Forage Allowance in Grazing Experiments. *Crop Science* **45**, 896–900.
- Stannard SR, Johnson NA (2003) Insulin resistance and elevated triglyceride in muscle: more important for survival than “thrifty” genes?. *Journal of Physiology* **554**, 595–607.
- Stickland NC (1978) A quantitative study of muscle development in the bovine foetus (*Bos indicus*). *Anatomia, Histologia, Embryologia* **7**, 193–205.
- Sunnucks P, Hales DF (1996) Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Biology and Evolution* **13**, 510–524.
- Tollefsen SE, Lajarasn R, McCusker RH, Clemmons DR, Rotwein P (1989) Insulin-like Growth Factors (IGF) in muscle development. *Journal of Biological chemistry* **264**, 13810-13817.
- Wu G, Bazer FW, Wallace JM, Spencer TE (2006) Board-invited review: Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *Journal of Animal Science* **84**, 2316–2337.
- Zhu MJ, Ford SP, Nathanielsz PW, Du M (2004) Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biology of reproduction* **71**, 1968-1973.

Zhu MJ, Ford SP, Means WJ, Hess BW, Nathanielsz PW, Du M (2006) Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *Journal of Physiology* **575**, 241-250.

4. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES GLOBALES

4.1. DISCUSIÓN GENERAL

Uno de los principales objetivos de la producción ovina es incrementar la producción de carne en cantidad, calidad y eficiencia para aumentar la disponibilidad de los productos para la exportación. Para ello se debe lograr la máxima eficiencia en la utilización del forraje y suplementaciones de manera de acompañar el aporte nutricional con la fisiología del animal. La programación fetal y el retardo del crecimiento intrauterino (RCIU) constituyen un desafío para la producción animal. Restricciones nutricionales durante la vida intrauterina pueden inducir RCIU en las crías, con posibles consecuencias en el desempeño productivo futuro. La subnutrición durante las etapas tempranas de la gestación no ha sido considerado de importancia debido a los bajos requerimientos del feto y al bajo impacto sobre el peso del cordero al nacer (Kenyon y Blair, 2014). La nutrición durante el último mes o último tercio de gestación ha sido priorizada debido al aumento de los requerimientos de la madre por el acelerado crecimiento fetal (Koong *et al.*, 1975), y al impacto que tiene la alimentación de la madre durante esa etapa, sobre el peso al nacimiento (Kenyon y Blair, 2014). Sin embargo, el proceso de diferenciación celular, así como el crecimiento y la vascularización de la placenta ocurren en etapas tempranas de la gestación, y son críticos para un normal desarrollo del feto (Clarke *et al.*, 1998; Belkacemi *et al.*, 2010).

En el presente estudio, ofertas de forraje de campo natural de 1,4 a 2,6 kg MS/kg de PV comparada con 2,9-3,8 kg materia seca (MS)/kg de PV durante la gestación indujeron un RCIU en las crías evidenciado por el menor peso al nacimiento y de órganos metabólicos y reproductivos, así como una disminución del peso de la carcasa y de la masa muscular de dos músculos de valor comercial, como son el ST y el LL. Sin embargo, los órganos del sistema nervioso central no se vieron afectados. En este estudio no se realizaron evaluaciones de la funcionalidad de los órganos, ni se realizaron estudios histológicos o moleculares excepto en los músculos. Por lo que no es posible determinar si la funcionalidad de los órganos pudo haber sido afectada. La subnutrición afectó tempranamente el desarrollo

muscular indicado por los menores diámetros de los fascículos musculares, menor cantidad de mionúcleos/fascículo en los músculos ST y LL y menor contenido de ARN en el ST en los fetos de 70 días. También los genitales externos sufrieron tempranamente los efectos de la subnutrición.

Los tratamientos aplicados, permitieron generar ambientes uterinos diferentes donde se desarrollaron los fetos y corderos, que explican el RCIU sufrido por los fetos y corderos del grupo BOF. Tanto el PV, la CC, como los niveles de insulina e IGF-I sugieren balances energéticos diferentes a pesar de la pérdida de PV y CC de las ovejas de AOF. La disminución de PV y CC de las ovejas de AOF se podría deber al bajo contenido de PC (6%) aunque la disponibilidad de campo natural fue de aproximadamente 1200 kg MS/ha. De acuerdo a las estimaciones, el factor restrictivo, al menos en el grupo de AOF, fue el aporte de proteína del campo natural, que no llegó a cubrir los requerimientos. Otro factor que pudo haber incidido en este grupo es que la oferta de forraje, aún en junio y julio, haya permitido expresar la selectividad característica de la especie. Por lo que estos animales quizás, hayan tenido mayores gastos energéticos de actividad y costos de cosecha en la búsqueda de materiales más finos, tiernos y de mayor calidad. En promedio, cada medio punto de CC que perdieron las ovejas, hubo una pérdida de 6 a 7 kilos de PV.

A pesar de que todas las ovejas fueron manejadas de la misma forma y estuvieron en las mismas condiciones, las que fueron sacrificadas a los 70 días de gestación no presentaron diferencias en PV entre tratamientos sino hasta el día 58 de gestación (junio). A partir de ese mes las ovejas del grupo AOF fueron más pesadas que las del grupo BOF. En cambio, en las madres de corderos neonatos se encontraron diferencias entre ambos grupos nutricionales desde el día de la concepción (día 0). Mientras que las ovejas del grupo BOF comenzaron a perder peso a partir del día 24 de gestación, las de AOF comenzaron a perder PV a partir del día 58. El desarrollo muscular comienza durante la gestación temprana, a partir de la 2do y 3er semana de gestación. Por lo que este proceso se desarrolló, en ambos grupos de corderos, en condiciones de nutrición contrastante.

La placenta tiene un rol fundamental en el crecimiento fetal. Resultados preliminares de este trabajo (Álvarez-Oxiley *et al.*, 2014), reportaron un menor peso

de los placentomas en el grupo de BOF que en el de AOF a los 70 días de gestación, si bien no se encontraron diferencias en el número de placentomas entre tratamientos. Estos hallazgos permitirían plantear que la subnutrición sufrida por los fetos y corderos en el presente trabajo estaría mediada, al menos en parte, por una posible reducción del transporte de nutrientes de la madre al feto, lo que agravaría aún más las condiciones de subnutrición en que fueron gestados los corderos después del proceso de placentación. Este menor aporte de nutrientes al útero grávido produjo un RCIU y modificaciones en la priorización de la partición de nutrientes en feto, interfiriendo con el crecimiento y desarrollo de distintos órganos. El funcionamiento y metabolismo celulares también es afectado por la subnutrición, alterando la funcionalidad de órganos de especial importancia en el adulto, como el corazón y el hígado, lo que trae aparejado consecuencias para la salud, bienestar (Barker, 2003; Hocher, 2014) y capacidad productiva de los individuos adultos (Rhind, 2004).

En el primer trabajo, la BOF no solo afectó el peso al nacer de los corderos sino también se observó un crecimiento intrauterino desproporcional. En efecto, los pesos de los órganos del sistema nervioso central de los corderos del grupo BOF no fueron diferentes de los presentados por los corderos del grupo AOF. Sin embargo, los corderos de BOF fueron más bajos y finos y presentaron diferencias en el peso de distintos órganos y una mayor relación peso de cerebro/peso de hígado que los corderos de AOF. Estos son indicadores que permiten identificar los fetos o corderos que han sufrido un RCIU (Mitchell, 2001; Gluckman y Pinal, 2003; Wu *et al.*, 2004, 2006; Belkacemi *et al.*, 2010). Parecería que los fetos priorizaron el crecimiento de los órganos centrales en desmedro de los órganos periféricos. Se pudo observar que la priorización en la partición de los nutrientes fue máxima para los órganos del sistema nervioso central, seguida por los órganos metabólicos (riñón, hígado y menos priorizadas las glándulas adrenales), luego los órganos reproductivos y priorización mínima para los genitales externos y los órganos que componen la carcasa.

En el segundo trabajo se pudo observar que los músculos LL y ST de fetos de 70 días y corderos neonatos fueron afectados cuando se les ofrece una baja oferta de forraje a sus madres durante la gestación, confirmando la baja priorización que tiene el músculo en la partición de nutrientes. Los resultados, tanto histológicos como

moleculares, indicaron que una BOF provocó, tanto en fetos como en corderos, un menor desarrollo muscular. De acuerdo a la literatura (Greenwood *et al.*, 2000) estos animales podrían haber tenido una menor capacidad potencial de alcanzar músculos del mismo tamaño que los corderos de AOF en la vida adulta. Aún más, los corderos de BOF tuvieron menor proporción de tejido muscular y mayor de tejido no muscular (adiposo y conectivo) por lo que además de menor producción de masa muscular, la BOF podría afectar la calidad de la carne producida por estos animales. Un pobre desarrollo del músculo esquelético durante la etapa fetal perjudicaría el metabolismo de la glucosa y de ácidos grasos en el órgano, lo que puede provocar una predisposición en la descendencia a la diabetes y obesidad (Stannard y Johnson, 2003).

Por otra parte, el efecto de la BOF sobre el peso del hígado podría influir en los procesos metabólicos del animal en su vida extrauterina, con el consiguiente perjuicio sobre el crecimiento y engorde de los corderos. Si bien en este trabajo no se realizaron estudios histológicos o moleculares de las muestras hepáticas, Gao *et al.* (2014) demostraron que subnutriciones durante la gestación en ovejas determinaron menor cantidad de parénquima hepático en el órgano así como vías metabólicas alteradas. Cuando las ovejas sufren una subnutrición durante la gestación, la priorización de los nutrientes que se lleva a cabo por parte del feto durante su desarrollo, estaría en detrimento de aspectos fundamentales para la producción ovina, como lo son el aparato reproductivo, el muscular y los procesos hepáticos, pilares fundamentales de la producción de carne ovina.

Se ha planteado que otros mecanismos estarían involucrados en la programación fetal durante la vida intrauterina. Recientemente se ha publicado una revisión al respecto (Hoche, 2014). Se ha planteado la hipótesis de la programación fetal avanzada en humanos, la que propone que un gen materno o paterno puede influir en la fisiología de la descendencia sin estar presente en el individuo. La epigenética o cambios en el ADN e histonas no vinculados a modificaciones en la secuencia de nucleótidos pero que modifican la estructura y la condensación de la cromatina, afectan la expresión génica y el fenotipo de los individuos. Factores ambientales actuando a través de este proceso podrían influir en las rutas

metabólicas, en la descendencia de los animales que sufren subnutrición durante la etapa intrauterina. Sin embargo, no habría un mecanismo molecular común mediando el proceso de epigénesis (Wimmers *et al.*, 2015). La nutrición materna influiría la expresión génica de su descendencia a través del proceso de epigenética (Wimmers *et al.*, 2015).

4.2. CONCLUSIONES GLOBALES

Restricciones nutricionales provocadas por una oferta de forraje de 1,4-2,6 kg de MS/kg de peso vivo desde 23 días antes de la concepción hasta 23 días antes del parto en ovejas, inducen un RCIU y afectan la priorización en la partición de los nutrientes en fetos y corderos. Las ovejas del grupo BOF parecen no haber podido amortiguar la restricción nutricional sufrida sobre el desarrollo y crecimiento de sus fetos, que provoca no solo una disminución del peso fetal que se amplifica al parto sino también un crecimiento y desarrollo diferencial de los órganos. Frente a una subnutrición intrauterina los fetos priorizan el crecimiento de los órganos centrales en desmedro de órganos periféricos. El desarrollo muscular se ve afectado tanto en aspectos histológicos como moleculares, manifestado en los músculos LL y ST, comprometiendo el futuro potencial productivo de las crías. Ambos músculos reaccionan de manera diferente cuando la restricción se prolonga.

Con los resultados obtenidos, nuestra hipótesis es que el orden de prioridades para la partición de la energía es máxima en los órganos del sistema nervioso central y corazón, intermedia en riñones, hígado y glándulas adrenales, baja para los órganos reproductivos y muy baja para el desarrollo muscular y los genitales externos.

4.3. IMPLICANCIAS

En un sistema pastoril cuya base forrajera es el campo natural como es el caso del Uruguay, estos resultados tienen implicancias prácticas. La nutrición durante las etapas tempranas de la gestación, que no ha sido priorizada hasta ahora, debería ser tenida en cuenta a partir de los resultados encontrados en el presente trabajo en los fetos de 70 días. Por otra parte, un drástico aumento en el plano nutricional 3 semanas antes del parto no compensaría una subnutrición severa provocada por una

BOF durante la gestación, provocando no solo que los corderos tengan menores pesos al nacer sino que sean diferentes morfológicamente, con menos masa muscular y menor potencial de hipertrofia muscular en la vida extrauterina.

Se requieren más estudios sobre ofertas de forrajes de campo natural en ovejas gestantes, que puedan aportar información para mejorar su utilización. Además, se requieren estudios de más larga duración para evaluar el efecto de la subnutrición intrauterina provocada por ofertas de forraje en los animales adultos y en su descendencia tanto de machos como de hembras.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Allen RE, Merkel RA, Young RB. 1979. Cellular aspects of muscle growth: Myogenic cell proliferation. *Journal of Animal Science*, 49: 115-127.
- Allen VG, Batello C, Berretta EJ, Hodgson J, Kothmann M, Li X, McIvor J, Milne J, Morris C, Peeters A, Sanderson M. 2011. An international terminology for grazing lands and grazing animals. *Grass and Forage Science*, 66: 2–28
- Álvarez-Oxiley A, López Pérez MB, Añón V, López Pérez AG, Abud MJ, Bielli A, Regueiro M, Lopez Mazz C, Rico DE, Pérez-Clariget R. 2014. Restricción nutricional durante la gestación en ovejas pastoreando campo natural: Efectos sobre el desarrollo de la placenta a los 70 días de gestación. En: Congreso de la Asociación Uruguaya de Producción Animal, AUPA (5°, 2014, Montevideo, Uruguay). Memorias. Montevideo. AUPA. Tomado de: CD-Rom.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2007. *Official Methods of Analysis*, 18th ed. Washington, D.C., USA: Association of Official Analytical Chemists.
- AOCS (American Oil Chemists' Society). 2012. *Official Methods and Recommended Practices*, 103rd ed. California, USA: American Oil Chemists' Society.
- Asmad K, Nakagawa S, Lopez-Villalobos N, Kenyon PR, Pain SJ, Blair HT. 2012. Effects of maternal nutrition during pregnancy on the growth and reproductive development of male sheep: a meta-analysis. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 72: 51-57.
- Astessiano AL, Pérez-Clariget R, Espasandín AC, López-Mazz C, Soca P, Carriquiry M. 2013. Metabolic, productive and reproductive responses to postpartum short-term supplementation in primiparous beef cows. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42: 246-253.
- Astessiano AL, Pérez-Clariget R, Quintans G, Soca P, Carriquiry M. 2011. Effects of a short-term increase in the nutritional plane before the mating period on metabolic and endocrine parameters, hepatic gene expression and reproduction in primiparous beef cows on grazing conditions. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96: 535-544.

- Banchero GE, Quintans G, Lindsay DR, Milton JT. 2009. A pre-partum lift in ewe nutrition from a high-energy lick or maize or by grazing *Lotus uliginosus* pasture, increases colostrum production and lamb survival. *Animal*, 3: 1183-1188.
- Banchero G, Quintans G, Milton J, Lindsay D. 2002. Supplementation during the last week of pregnancy of Corriedale ewes can improve colostrum and milk yield. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*, 24: 273.
- Barker DJP. 2003. The developmental origins of adult disease. *European Journal of Epidemiology*, 18: 733–736.
- Bauer MK, Breier BH, Harding JE, Veldhuiss JD, Gluckman PD. 1995. The fetal somatotrophic axis during long term maternal undernutrition in sheep: Evidence for nutritional regulation in utero. *Endocrinology*, 136: 1250-1257.
- Bauman D, Curie B. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, 63: 1514-1529.
- Bayol S, Jones D, Goldspink G, Stickland NC. 2004. The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. *British Journal of Nutrition*, 91: 331-339.
- Bee G. 2004. Effect of early gestation feeding, birth weight, and gender of progeny on muscle fiber characteristics of pigs at slaughter. *Journal of Animal Science*, 82: 826-836.
- Beermann DH. 1983. Effects of maternal dietary restriction during gestation and lactation, muscle, sex and age on various indices of skeletal muscle growth in the rat. *Journal of Animal Science*, 57: 328–337.
- Beermann DH, Cassens RG, Hausman GJ. 1978. A second look at fiber type differentiation in porcine skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 46: 125-132.
- Belkacemi L, Nelson DM, Desai M, Ross MG. 2010. Maternal undernutrition influences placental-fetal development. *Biology of Reproduction*, 83: 325–331.
- Beltrán I, Alomar D. 2011. Undernutrition during early gestation in sheep: Long term impact on the offspring. *Agro Sur*, 39 (3): 115-124.

- Bencini R, Purvis IW. 1990. The yield and composition of milk from Merino sheep. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*, 18: 144-148.
- Bermúdez R, Ayala W. 2005. Producción de forraje de un campo natural de la zona de lomadas del este. En: Gómez Miller R, Albicette MM. (Eds.). Seminario de actualización técnica en manejo de campo natural. Montevideo: INIA. (Serie Técnica, 151). pp. 33-40.
- Berretta EJ, San Julián R, Montossi F, Silva JA. 1994. Pasturas naturales y producción ovina en la región de basalto en Uruguay. En: Congreso Mundial del Merino (4°, 1994, Montevideo, Uruguay). Memorias. Montevideo. S.U.L. pp 259-278.
- Bianchi G, Garibotto G. 2006. Alternativas genéticas para producir carne ovina en sistemas pastoriles. *Revista Argentina de Producción Animal*, 26: 131-153.
- Bielli A, Pérez-Clariget R, Pedrana G, Milton JTB, López A, Blackberry M, Duncombe G, Rodríguez-Martínez H, Martin GB. 2002. Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reproduction, Fertility and Development*, 14: 333-337.
- Bielli A, Katz H, Pedrana G, Gastel MT, Moraña A, Castrillejo A, Lundeheim N, Forsberg M, Rodriguez-Martinez H. 2001. Nutritional management during fetal life and postnatal life, and the influence on testicular stereology and Sertoli cell numbers in Corriedale rams. *Small Ruminant Research*, 40: 62-71.
- Blair HT, Van der Linden DS, Jenkinson CMC, Morris ST, Mackenzie DDS, Peterson SW, Firth EC, Kenyon PR. 2011. Do ewe size and nutrition during pregnancy affect foetus and foetal organ weight in twins?. *Livestock Science*, 142: 99-107.
- Blair HT, Jenkinson CMC, Peterson SW, Kenyon R, Van der Linden DS, Davenport LC, Mackenzie DDS, Morris ST, Firth EC. 2010. Dam and grand dam feeding during pregnancy in sheep affects milk supply in offspring and reproductive performance in grand-offspring. *Journal of Animal Science*, 88: E40–E50.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

- Brameld JM, Fahey AJ, Langley-Evans SC, Buttery PJ. 2003. Nutritional and hormonal control of muscle growth and fat deposition. *Archiv Tierzucht, Dummerstorf*, 46: 143-156.
- Burton GJ, Fowden AL. 2012. Review. The placenta and developmental programming: Balancing fetal nutrient demands with maternal resource allocation. *Placenta*, 33: S23-S27.
- Cal-Pereyra L, Benech A, Da Silva S, Martín A, González-Montaña JR. 2011. Metabolismo energético en ovejas gestantes esquiladas y no esquiladas sometidas a dos planos nutricionales. Efecto sobre la reserva energética de sus corderos. *Archivos Médicos Veterinarios*, 43: 277-285.
- Calkins K, Devaskar SU. 2011. Fetal origins of adult disease. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 41: 158-76.
- Carámbula M. 1991. Aspectos relevantes para la producción forrajera. Montevideo: INIA. (Serie Técnica, 19). 49 p.
- Cheek DB. 1985. The control of cell mass and replication. The DNA unit - a personal 20-year study. *Early Human Development*, 12: 211-239.
- Chilliard Y, Delavaud C, Bonnet M. 2005. Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domestic Animal Endocrinology*, 29: 3-22.
- Clarke L, Heasman L, Juniper DT, Symonds ME. 1998. Maternal nutrition in early-mid gestation and placental size in sheep. *British Journal of Nutrition*, 79: 359-364.
- Costello PM, Rowleron A, Astaman NA, Anthony FW, Sayer AA, Cooper C, Hanson MA, Green LR. 2008. Peri-implantation and late gestation maternal undernutrition differentially affect fetal sheep skeletal muscle development. *Journal of Physiology*, 586: 2371-2379.
- Daniel ZCTR, Brameld JM, Craigon J, Scollan ND, Buttery PJ. 2007. Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on lamb carcass characteristics and muscle fiber composition. *Journal of Animal Science*, 85: 1565-1576.
- Debus N, Chavatte-Palmer P, Viudes G, Camous S, Roséfort A, Hassoun P. 2012. Maternal periconceptional undernutrition in Merinos d'Arles sheep: 1- Effects

- of pregnancy and reproduction results of dams and offspring growth performances. *Theriogenology*, 77: 1453-1465.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2014. [En línea]. En: Anuario estadístico agropecuario 2014. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 4 de agosto 2015. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2014>.
- Doney JM, Peart JN, Smith WF, Louda F. 1979. A consideration of the technique for estimation of milk yield by suckled sheep and a comparison of estimates obtained by two methods in relation to the effect of breed, level of production and stage of lactation. *Journal of Agricultural Science*, 92: 123-132.
- Du M, Wang B, Fu X, Yang Q, Zhu MJ. 2015. Review: Fetal programming in meat production. *Meat Science*, 109: 40-47.
- Du M, Tong J, Zhao JX, Underwood KR, Zhu MJ, Ford SP, Nathanielsz PW. 2010a. Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *Journal of Animal Science*, 88: 51-60.
- Du M, Yan X, Tong JF, Zhao J, Zhu MJ. 2010b. Maternal obesity, inflammation, and fetal skeletal muscle development. *Biology of Reproduction*, 82: 4-12.
- Dwyer CM. 2008. The welfare of the neonatal lamb. *Small Ruminant Research*, 76: 31-41.
- Dwyer CM, Stickland NC, Fletcher JM. 1994. The influence of maternal nutrition on muscle fibre number development in the porcine fetus and on subsequent postnatal growth. *Journal of Animal Science*, 72: 911-917.
- Ehrhardt RA, Slepatis RM, Bell AW, Boisclair YR. 2001. Maternal leptin is elevated during pregnancy in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*, 21: 85 - 96.
- Fahey AJ, Brameld JM, Parr T, Buttery PJ. 2005a. Ontogeny of factors associated with proliferation and differentiation of muscle in the ovine fetus. *Journal of Animal Science*, 83: 2330-2338.
- Fahey AJ, Brameld JM, Parr T, Buttery PJ. 2005b. The effect of maternal undernutrition before muscle differentiation on the muscle fiber development of the newborn lamb. *Journal of Animal Science*, 83: 2564-2571.

- FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal) (s/f), Tablas FEDNA para glicerina y salvado de arroz blanco. Consultada 2 setiembre de 2015. Disponible en: http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/glicerina-85-actualizado-abril-2012.
http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/salvado-de-arroz-blanco-14-ee.
- Fernández-Foren A, Abecia JA, Vázquez MI, Forcada F, Sartore I, Carriquiry M, Meikle A, Sosa C. 2011. Restricción alimenticia en ovinos: respuesta endocrino-metabólica dependiente de las reservas corporales. ITEA 107, 257-271.
- Ferreira G, Quintans G, Brito G, Baldi F, Banchemo G, Piaggio L. 2014. Peso al nacimiento, destete y a la faena en la progenie de ovejas restringidas nutricionalmente desde día 45 al 115 de gestación. En: Congreso de la Asociación Uruguaya de Producción Animal, AUPA (5°, 2014, Montevideo, Uruguay). Memorias. Montevideo. AUPA. Tomado de: CD-Rom.
- Ford SP, Hess BW, Schwoppe MM, Nijland MJ, Gilbert JS, Vonnahme KA, Means WJ, Han H, Nathanielsz PW. 2007. Maternal undernutrition during early to mid-gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in male offspring. *Journal of Animal Science*, 85: 1285-1294.
- Formoso D. 2005. La investigación en utilización de pasturas naturales sobre cristalino desarrollada por el secretariado uruguayo de la lana. En: Gómez Miller R, Albicette MM. (Eds.). Seminario de actualización técnica en manejo de campo natural. Montevideo: INIA. (Serie Técnica, 151). pp. 51-60.
- Freitas-de-Melo A, Ungerfeld U, Hötzel MJ, Abud MJ, Alvarez-Oxiley A, Orihuela A, Damián JP, Pérez-Clariget R. 2015. Mother–young behaviours at lambing in grazing ewes: Effects of lamb sex and food restriction in pregnancy. *Applied Animal Behaviour Science*, 168: 31–36.
- Gao F, Yingchun L, Lingyao L, Ming L, Chongzhi Z, Changjin A, Xianzhi H. 2014. Effects of maternal undernutrition during late pregnancy on the development and function of ovine fetal liver. *Animal Reproduction Science*, 147: 99-105.

- Gao F, Liu YC, Hou XZ. 2013. Effect of maternal undernutrition during late pregnancy on hormonal status and metabolic changes in neonatal lambs. *Czech Journal of Animal Science*, 58: 15–20.
- García Pintos M, Pereyra F. 2012. Suplementación durante el último mes de gestación en vacas de cría: efecto sobre el crecimiento y adipogénesis muscular en terneros al destete. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 65 p.
- Gardner DS, Buttery PJ, Daniel Z, Symonds ME. 2007. Factors affecting birth weight in sheep: maternal environment. *Reproduction*, 133(1): 297-307.
- Gastel T, Bielli A, Perez R, Lopez A, Castrillejo A, Tagle R, Franco J, Laborde D, Forsberg M, Rodriguez-Martinez H. 1995. Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corriedale rams. *Animal Reproduction Science*, 40: 59-75.
- Gluckman PD, Pinal CS. 2003. Regulation of fetal growth by the somatotrophic axis. *Journal of Nutrition*, 133: 1741-1746.
- Gootwine E. 2013. Meta-analysis of morphometric parameters of late-gestation fetal sheep developed under natural and artificial constraints. *Journal of Animal Science*, 91: 111-119.
- Greenwood PL, Bell AW. 2003. Consequences of intra-uterine growth retardation for postnatal growth, metabolism and pathophysiology. *Reproduction Supplement*, 61: 195-206.
- Greenwood PL, Hunt AS, Hermanson JW, Bell AW. 2000. Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: II. Skeletal muscle growth and development. *Journal of Animal Science*, 78: 50-61.
- Gunn RG, Sim DA, Hunter EA. 1995. Effects of nutrition *in utero* and in early life on the subsequent lifetime reproductive performance of Scottish Blackface ewes in two managements systems. *Animal Science*, 60: 223-230.
- Hafez ESE. 1952. Studies on the breeding season and reproduction of the ewe. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)*, 42: 189-265.

- Haydock KP, Shaw NH. 1975. The comparative yield method for estimating dry matter yield of pastures. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 5: 663-670.
- Hocher B. 2014. More than genes: the advanced fetal programming hypothesis. *Journal of reproductive immunology*, 104-105: 8-11.
- Houba PHJ, Te Pas MFW. 2004. The Muscle Regulatory Factors Gene Family in Relation to Meat Production. En: Te Pas MFW, Everts ME, Haagsman HP. (Eds.). *Muscle Development of Livestock Animals: Physiology, Genetics and Meat Quality*. Trowbridge: Cromwell Press. pp. 201-223.
- Jainudeen MR, Hafez ESE. 1996. Gestación, Fisiología prenatal y parto. En: Hafez ESE (Ed.). *Reproducción e Inseminación Artificial en animales*. Interamericana: Mc Graw-Hill (6ta ed.). pp. 203- 224.
- Jaquiere AL, Oliver MH, Honeyfield-Ross M, Harding JE, Bloomfield FH. 2012. Peri-conceptual undernutrition in sheep affects adult phenotype only in males. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012: 1-7.
- Jefferies BC. 1961. Body condition scoring and its use in management. *Tasmanian Journal of Agriculture*, 32: 19-21.
- Jochims F, Poli CHEC, Carvalho PCF, David DB, Campos NMF, Fonseca L, Amaral GA. 2013. Grazing methods and herbage allowances effects on animal performances in natural grassland grazed during winter and spring with early pregnant ewes. *Livestock Science*, 155: 36-372.
- Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP. 1997. Uterine growth, cell proliferation, and c-fos proto-oncogene expression throughout the estrous cycle in ewes. *Biology of reproduction*, 56(2): 393-401.
- Johnston DM, Stewart DF, James WGM. 1975. Effect of breed and time on feed on the size and distribution of beef muscle fiber types. *Journal of Animal Science*, 40: 613-620.
- Kenyon PR, Blair HT. 2014. Foetal programming in sheep – Effects on production. *Small Ruminant Research*, 118: 16-30.
- Kenyon PR, Van Der Linden DS, Blair HT, Morris ST, Jenkinson CMC, Peterson SW, Mackenzie DDS, Firth EC. 2011a. Effects of dam size and nutritional

- plane during pregnancy on lamb performance to weaning. *Small Ruminant Research*, 97: 21-27.
- Kenyon PR, Van Der Linden DS, Jenkinson CMC, Morris ST, Mackenzie DDS, Peterson SW, Firth EC, Blair HT. 2011b. The effects of ewe size and nutritional regimen beginning in early pregnancy on development of singleton foetuses in late pregnancy. *Livestock Science*, 142: 92-98.
- Kenyon PR, Blair HT, Jenkinson CMC, Morris ST, Mackenzie DDS, Peterson SW, Firth EC, Johnson PL. 2009. The effect of ewe size and nutritional regimen beginning in early pregnancy on ewe and lamb performance to weaning. *NZ Journal of Agricultural Research*, 52: 203-212.
- Koong LJ, Garrett WN, Rattray PV. 1975. A Description of the Dynamics of Fetal Growth in Sheep. *Journal of Animal Science*, 41: 1065-1068.
- Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA. 2007. Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. *Cell*, 129 (5): 999-1010.
- Lawrie RA. 1998. *Ciencia de la carne*. Zaragoza, España: Acribia. (3ra ed.). 367 p.
- Lea RG, Andrade LP, Rae MT, Hannah LT, Kyle CE, Murray JF, Rhind SM, Miller DW. 2006. Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on apoptosis regulators in the ovine fetal ovary. *Reproduction*, 131: 113-124.
- Long NM, Vonnahme KA, Hess BW, Nathanielsz W, Ford SP. 2009. Effects of early gestational undernutrition on fetal growth, organ development, and placentomal composition in the bovine. *Journal of Animal Science*, 87: 1950-1959.
- Machado P, Muzzio AC. 2013. Impacto de la nutrición materna durante la gestación sobre las características del tejido muscular en terneros hijos de vacas puras y cruzas. Tesis Dr. Ciencias Veterinaria. Montevideo, Uruguay. Facultad de Veterinaria. 50 p.
- Maier A, Mcewan JC, Dodds KG, Fischman DA, Fitzsimons RB, Harris AJ. 1992. Myosin heavy chain composition of single fibres and their origins and distribution in developing fascicles of sheep tibialis cranialis muscles. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 13 (5): 551-72.

- Mitchell ML. 2001. Fetal Brain to Liver Weight Ratio as a Measure of Intrauterine Growth Retardation: Analysis of 182 Stillborn Autopsies. *Modern Pathology*, 14: 14-19.
- Morrison JL. 2008. Sheep models of intrauterine growth restriction: Fetal adaptations and consequences. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 35, 730-743.
- Muñoz C, Carson AF, McCoy MA, Dawson LE, Wylie AR, Gordon AW. 2009. Effects of plane of nutrition of ewes in early and mid-pregnancy on performance of the offspring: female reproduction and male carcass characteristics. *Journal of Animal Science*, 87: 3647-55.
- Nathanielsz PW, Hanson MA. 2003. The fetal dilemma: spare the brain and spoil the liver. *Journal of Physiology*, 548: 333.
- Noziere P, Attaix D, Bocquier F, Doreau M. 1999. Effects of underfeeding and refeeding on weight and cellularity of splanchnic organs in ewes. *Journal of Animal Science*, 77: 2279-2290.
- NRC (National Research Council). 2007. Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and new world camelids. Washington, DC, USA. National Academy Press. 362 p.
- NRC (National Research Council). 1985. Nutrient requirements of sheeps. Sixth Revised Edition. Washington, D.C., USA. 111 p.
- Oksbjerg N, Gondret F, Vestergaard M. 2004. Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system. *Domestic Animal Endocrinology*, 27: 219-240.
- Osgerby JC, Wathes DC, Howard D, Gadd TS. 2002. The effect of maternal undernutrition on ovine fetal growth. *Journal of Endocrinology*, 173: 131-141.
- Pérez-Clariget R, Banchero G, López A, Blackberry MA, Blache D, Milton JTB, Martin GB. 2003. A low energy diet fed to pregnant ewes affects the metabolism of the ewes and their lambs. En: World conference on Animal Production. (9°, 2003, Porto Alegre, Brasil). Proceedings. Rio Grande do Sul. pp. 224.

- Rae MT, Kyle CE, Miller DW, Hammond AJ, Brooks AN, Rhind SM. 2002. The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Animal Reproduction Science*, 72: 63-71.
- Rehfeldt C, Stickland NC, Fiedler I. 2004. Number and Size of Muscle Fibers in Relation to Meat Production. En: Te Pas MFW, Everts ME, Haagsman HP. (Eds.). *Muscle Development of Livestock Animals: Physiology, Genetics and Meat Quality*. Trowbridge: Cromwell Press. pp. 1-38.
- Rehfeldt C, Stickland NC, Fiedler I, Wegner J. 1999. Environmental and genetic factors as sources of variation in skeletal muscle fibre number. *Basic and Applied Myology*, 9: 237-255.
- Rhind SM. 2004. Effects of maternal nutrition on fetal and neonatal reproductive development and function. *Animal Reproduction Science*, 82: 169-181.
- Rhind SM, Rae MT, Brooks AN. 2001. Effects of nutrition and environment factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction*, 122: 205-214.
- Sainz RD, Bentley BE. 1997. Visceral Organ Mass and Cellularity in Growth-Restricted and Refed Beef Steers. *Journal of Animal Science*, 75: 1229-1236.
- Santello GA, Fonseca de Macedo FA, Gomes de Macedo RM, Nunes Martins E, Lourenço FJ, Jacobs Dias F. 2010. Características das fibras musculares de cordeiros nascidos de ovelhas recebendo suplementação proteica no terço inicial da gestação. *Revista Brasileira Zootecnia*, 39 (10): 2288-2296.
- Smith NA, McAuliffe FM, Quinn K, Lonergan P, Evans ACO. 2010. The negative effects of a short period of maternal undernutrition at conception on the glucose–insulin system of offspring in sheep. *Animal Reproduction Science*, 121 (1-2): 94-100.
- Sollenberger LE, Moore JE, Allen VG, Pedreira CGS. 2005. Reporting Forage Allowance in Grazing Experiments. *Crop Science*, 45: 896-900.
- Sphor L, Banchemo G, Correac G, Osórioa MTM, Quintans G. 2011. Early prepartum shearing increases milk production of wool sheep and the weight of the lambs at birth and weaning. *Small Ruminant Research*, 99: 44-47.

- Stannard SR, Johnson NA. 2003. Insulin resistance and elevated triglyceride in muscle: More important for survival than “thrifty” genes. *Journal of Physiology*, 554(3): 595-607.
- Stickland NC. 1978. A quantitative study of muscle development in the bovine foetus (*Bos indicus*). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 7: 193-205.
- Sunnucks P, Hales DF. 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Biology and Evolution*, 13: 510-524.
- Swatland HJ. 1973. Muscle growth in the fetal and neonatal pig. *Journal of Animal Science*, 37: 536-545.
- Tollefsen SE, Lajarasn R, McCusker RH, Clemmons DR, Rotwein P. 1989. Insulin-like Growth Factors (IGF) in muscle development. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 13810-13817.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. Symposium, Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 74(10): 3583-3597.
- Vatnick I, Schoknecht PA, Darrigrand R, Bell AW. 1991. Growth and metabolism of the placenta after unilateral fetectomy in twin pregnant ewes. *Journal of Developmental Physiology*, 15: 351-356.
- Vonnahme KA, Hess BW, Nijland MJ, Nathanielsz PW, Ford SP. 2006. Placentomal differentiation may compensate for maternal nutrient restriction in ewes adapted to harsh range conditions. *Journal of Animal Science*, 84: 3451-3459.
- Vonnahme KA, Hess BW, Hansen TR, McCormick RJ, Rule DC, Moss GE, Murdoch WJ, Nijland MJ, Skinner DC, Nathanielsz PW, Ford SP. 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: 133-140.
- Wallace JM, Regnault TRH, Limesand SW, Hay WW, Anthony RV. 2005. Investigating the causes of low birth weight in contrasting ovine paradigms. *Journal of Physiology*, 565: 19-26.

- Wimmers KN, Trakooljul MO, Murani E, Ponsuksili S. 2015. Epigenetic mechanisms and their implications in animal breeding. En: Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (66th, 2015, Warsaw, Poland). Proceedings. Warsaw, Poland: EAAP Scientific Committee (Ed.). Book of abstracts. pp. 185.
- Wu G, Bazer FW, Wallace JM, Spencer TE. 2006. Board-invited review: Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *Journal of Animal Science*, 84: 2316-2337.
- Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, Spencer TE. 2004. Maternal nutrition and fetal development. *Journal of Nutrition*, 134: 2169-2172.
- Zambrano E, Guzman C, Rodríguez-González GL, Durand-Carbajal M, Nathanielsz PW. 2014. Review: Fetal programming of sexual development and reproductive function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382:538-549.
- Zhu MJ, Ford SP, Means WJ, Hess BW, Nathanielsz PW, Du M. 2006. Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *Journal of Physiology*, 575: 241-250.
- Zhu MJ, Ford SP, Nathanielsz PW, Du M. 2004. Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biology of reproduction*, 71: 1968-1973.