



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

# **Efecto de la oferta de forraje de campo natural gestacional sobre el desarrollo muscular de corderos**

Javier Ithurrealde Lemes

Doctorado en Ciencias Agrarias

Julio 2022

Tesis aprobada por el tribunal integrado por (Ing. Agr. (PhD.) Albina Sanz; Presidenta), (Ing. Agr. (PhD.) Mariana Carriquiry; Relatora) y (Lic. Biol. (PhD.) Eileen Armstrong; Relatora), el 28 de julio de 2022. Autor: Dr. en Cien. Vet. (MSc.) Javier Ithurrealde. Director: Dr. en Med. y Tec. Vet. (PhD.) Alejandro Bielli; Codirectora: Dra. en Med. y Tec. Vet. (PhD.) Raquel Pérez Clariget; Codirector: Lic. Biol. (PhD.) Ali Saadoun.

«Debemos buscar el comienzo de todo, de seguro, en la nube que reventó en lluvia  
aquella tarde, con tan inesperada violencia que sus truenos parecían truenos de otra  
latitud»

«La verdad es mucho más hermosa.»

Alejo CARPENTIER, *Los pasos perdidos*

«Quien más sabe más hará por sus semejantes.»

Alejo CARPENTIER, *El siglo de las luces*

Para Pedro  
Para Manuel  
Para Ana

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco primero que nada a mi familia: padres por estimular mi continua formación, queridos hermanos por su cariño y a mi esposa e hijos, el motor y el alma de mi vida, por su amor y apoyo en este difícil desafío.

A Alejandro, mi orientador, gracias por despertar mi vocación por investigar. Gracias por haber confiado en mí siempre y por haberme enseñado tanto, no solo en lo estrictamente académico, sino también en el espíritu con el que se deben encarar la investigación y la formación. Hacen falta muchos más buenos y apasionados docentes y que además sean mejores personas como lo sos vos.

A Raquel, coorientadora, gracias por haber apostado a mí y por toda la tremenda ayuda que me diste. Trabajaste durísimo en los experimentos y me ofreciste el apoyo decisivo para que esto saliera adelante. Admiro muchísimo tu inteligencia, tu capacidad de trabajo, tu permanente apuesta a más y la pasión con la que lo hacés. Para vos, de corazón, solo tengo palabras de agradecimiento.

A Alí, coorientador, gracias por la confianza en mi capacidad y por el apoyo en el trabajo.

A los diferentes compañeros y compañeras con los que compartimos distintas partes de este enorme trabajo: María José Abud, pilar fundamental del trabajo de campo y con quien también compartimos trabajo de laboratorio, Álvaro López, quien prestó apoyo fundamental y trabajó muchísimo para que los experimentos salieran adelante, Patricia Genovese, compañera fundamental para el tremendo trabajo de laboratorio histológico.

Amigos, compañeros, tesistas y coautores que apoyaron trabajos de campo, de faena, muestreo y laboratorio: Cristina Cabrera, Ana Laura Astessiano, Diego Petrone, Nicolás Zunino, Florencia Corrales, Yésica López, Oscar Feed, Danilo Fila, María

del Jesús Marichal, Victoria Añón, Victoria Riaño, María Belén López, Andrea Álvarez Oxiley, Alberto Casal, Ignacio Sosa, Javier Díaz, Guido Carballo, Estefanía Marín, Andrea González, Dana Montedónico.

Al Departamento de Producción Animal de la Fagro, y a la Estación Experimental Bernardo Rossengurt, personal y compañeros, y en particular a Laura Astigarraga y Carlos Mantero por el apoyo institucional.

Al área de histología y embriología de la Fvet.

A la CSIC; parte de este trabajo se financió con fondos del proyecto CSIC-Iniciación/2017 otorgado a J. Ithurralde.

## TABLA DE CONTENIDO

|                                                                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| PÁGINA DE APROBACIÓN.....                                                                                                                    | II  |
| DEDICATORIA.....                                                                                                                             | III |
| AGRADECIMIENTOS.....                                                                                                                         | IV  |
| TABLA DE CONTENIDO.....                                                                                                                      | VI  |
| RESUMEN.....                                                                                                                                 | IX  |
| SUMMARY.....                                                                                                                                 | X   |
| <u>1. INTRODUCCIÓN</u> .....                                                                                                                 | 1   |
| 1.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO.....                                                                                                                | 2   |
| 1.2 OBJETIVO GENERAL.....                                                                                                                    | 3   |
| 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                                                                                               | 3   |
| 1.4 ESTRUCTURA GENERAL DE LA TESIS.....                                                                                                      | 3   |
| 1.5 MARCO TEÓRICO.....                                                                                                                       | 5   |
| 1.5.1 <u>El tejido muscular esquelético y la diversidad fibrilar. Importancia para la producción animal y la calidad de la carne</u> .....   | 5   |
| 1.5.2 <u>Miogénesis en los animales de producción</u> .....                                                                                  | 9   |
| 1.5.2.1 Proceso básico de formación de las fibras musculares.....                                                                            | 9   |
| 1.5.2.2 Diferentes generaciones de precursores fibrilares. Miogénesis bifásica en los animales productivos.....                              | 10  |
| 1.5.2.3 Regulación de la miogénesis prenatal.....                                                                                            | 12  |
| 1.5.2.4 Crecimiento muscular posnatal.....                                                                                                   | 15  |
| 1.5.2.5 Diferenciación metabólica y contráctil fibrilar.....                                                                                 | 18  |
| 1.5.3 <u>Programación fetal y su efecto sobre el desarrollo muscular y la producción de carne</u> .....                                      | 20  |
| 1.5.3.1 Origen del concepto e importancia para la producción animal.....                                                                     | 20  |
| 1.5.3.2 Programación fetal y priorización de nutrientes: el dilema fetal ante la restricción y sus efectos sobre el desarrollo muscular..... | 22  |
| 1.5.3.3 Efectos de programación fetal sobre el desarrollo muscular prenatal.....                                                             | 23  |

|                                                                                                                                                                                                           |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1.5.3.4 Efectos sobre la expresión de MRFs, la mitosis mioblástica y la regulación del ciclo celular: la base molecular de los efectos de programación fetal sobre la miogénesis.....                     | 25         |
| 1.5.3.5 Efectos de programación fetal sobre la composición fibrilar.....                                                                                                                                  | 30         |
| 1.5.3.6 ¿Qué mecanismos pueden explicar los cambios fibrilares tras el RCIU?....                                                                                                                          | 35         |
| 1.5.3.7 Efectos sobre la calidad de la carne.....                                                                                                                                                         | 37         |
| 1.5.3.8 Diferentes músculos de la canal pueden presentar susceptibilidades distintas a los efectos de programación fetal.....                                                                             | 42         |
| 1.5.3.9 Efectos de programación fetal sobre el desempeño productivo de animales carniceros.....                                                                                                           | 46         |
| 1.5.4 Efectos sexo-dependientes de programación fetal.....                                                                                                                                                | 49         |
| <u>2. EFECTO DE UNA MENOR OFERTA DE FORRAJE DE CAMPO NATURAL DURANTE LA GESTACIÓN SOBRE LA MIOGÉNESIS FETAL.....</u>                                                                                      | <u>54</u>  |
| <u>3. EFECTO DE UNA MENOR OFERTA DE FORRAJE DE CAMPO NATURAL DURANTE LA GESTACIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS MUSCULARES EN CORDEROS NEONATOS.....</u>                                                      | <u>63</u>  |
| <u>4. EFECTO DE UNA MENOR OFERTA DE FORRAJE DE CAMPO NATURAL DURANTE LA GESTACIÓN Y DEL SEXO DE LA CRÍA SOBRE EL CRECIMIENTO, EL DESEMPEÑO PRODUCTIVO Y LA APTITUD CARNICERA DE CORDEROS PESADOS.....</u> | <u>84</u>  |
| <u>5. EFECTO DE UNA MENOR OFERTA DE FORRAJE DE CAMPO NATURAL DURANTE LA GESTACIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS MUSCULARES Y LA CALIDAD DE LA CARNE DE CORDEROS PESADOS.....</u>                              | <u>96</u>  |
| <u>6. DISCUSIÓN GENERAL.....</u>                                                                                                                                                                          | <u>106</u> |
| 6.1 UNA MENOR OFERTA DE CAMPO NATURAL GESTACIONAL AFECTA EL DESARROLLO MUSCULAR Y LIMITA EL POTENCIAL PRODUCTIVO DE LA PROGENIE.....                                                                      | 106        |
| 6.2 ¿CÓMO SE EXPLICAN NUESTROS HALLAZGOS? IMPORTANCIA DEL MOMENTO Y DEL TIPO DE SUBNUTRICIÓN SOBRE EL DESARROLLO MUSCULAR.....                                                                            | 107        |

|                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.3 PROGRAMACIÓN FETAL POR SUBNUTRICIÓN EN LA MIOGÉNESIS OVINA. APORTE DE NUESTROS RESULTADOS A UN POSIBLE MODELO EXPLICATIVO ..... | 110 |
| 6.4 PROGRAMACIÓN FETAL POR SUBNUTRICIÓN. IMPACTO SOBRE LA DIVERSIDAD FIBRILAR.....                                                  | 117 |
| 6.5 PROGRAMACIÓN FETAL POR SUBNUTRICIÓN. IMPACTO SOBRE LA CALIDAD DE LA CARNE.....                                                  | 121 |
| 6.6 EFECTOS SEXO-DEPENDIENTES DE PROGRAMACIÓN FETAL POR SUBNUTRICIÓN. APORTE DE NUESTROS RESULTADOS.....                            | 126 |
| <u>7. CONCLUSIONES</u> .....                                                                                                        | 132 |
| <u>8. BIBLIOGRAFÍA</u> .....                                                                                                        | 133 |

## RESUMEN

Para estudiar el efecto de una subnutrición gestacional inducida por una menor oferta de campo natural sobre la miogénesis y la producción cárnica en corderos se realizaron dos experimentos. En el primero ovejas Corriedale se alimentaron con ofertas de campo natural contrastantes (23 días antes de la concepción hasta el día 122 de gestación) y se evaluó la miogénesis en fetos de 70 días y neonatos. En el segundo ovejas similares se alimentaron con ofertas de campo natural contrastantes (día 30 de gestación hasta el parto) y se evaluó el desempeño productivo, la cantidad y calidad de carne y las características musculares en corderos de 200 días. Una menor oferta de forraje afectó la miogénesis fetal (menos fibras secundarias) y se asoció con menor actividad mitótica y de fusión mioblástica en algunos músculos. En neonatos, la subnutrición materna afectó la histología muscular, las propiedades contráctiles y biológicas fibrilares (MyHC-I y GLUT-4). Asimismo, la subnutrición redujo fuertemente el IGF-1 muscular pudiendo comprometer la compensación hipertrófica neonatal. Por otra parte, la subnutrición materna desde el día 30 hasta el parto afectó el crecimiento, la calidad de la canal y los pesos musculares a los 200 días, aunque estos efectos fueron fundamentalmente sexo-dependientes, siendo los machos los más afectados. La subnutrición materna afectó la composición fibrilar (más actividad oxidativa) en todos los músculos a los 200 días. Las características bioquímicas y de calidad de carne también se afectaron, aunque estos efectos dependieron tanto del músculo como del sexo. En síntesis, una menor oferta de forraje gestacional afectó negativamente la miogénesis fetal y las características musculares neonatales (peores capacidades hipertróficas), e indujo efectos de programación fetal sobre la masa y las características musculares a los 200 días. Esto implica que, independientemente de las condiciones posnatales, las alteraciones intrauterinas inducen cambios musculares, que pueden relacionarse con la habilidad para crecer y la calidad de la carne producida. Asimismo, nuestros resultados destacan la importancia de considerar el sexo del animal y el músculo a la hora de estudiar estos efectos.

**Palabras clave:** miogénesis, programación fetal, tipos fibrilares, calidad de carne.

## EFFECT OF GESTATIONAL NATURAL PASTURE ALLOWANCE ON MUSCLE DEVELOPMENT OF LAMBS

### SUMMARY

To study the effects of gestational undernutrition induced by a lower natural pasture allowance on myogenesis and meat production in lambs, two experiments were carried out. In the first, Corriedale sheep were fed contrasting natural pasture allowances (23 days before conception until gestation day 122) and myogenesis was evaluated in 70-day-old fetuses and newborns. In the second, similar ewes were fed with contrasting natural pasture allowances (day 30 of gestation until parturition) and the productive performance, quantity and quality of meat and muscular characteristics in 200-day-old lambs were evaluated. A lower pasture allowance affected fetal myogenesis (fewer secondary fibers) and was associated with reduced mitotic and myoblastic fusion activity in some muscles. In newborns, maternal undernutrition affected muscle histology, fibrillar biological and contractile properties (MyHC-I and GLUT-4). Likewise, undernutrition strongly reduced muscle IGF-1 and could compromise neonatal hypertrophic compensation. On the other hand, maternal undernutrition from day 30 to parturition affected growth, carcass quality and muscle weights at 200 days, although these effects were mainly sex-dependent, with males being the most affected. Maternal undernutrition affected fibrillar composition (greater oxidative activity) in all muscles at 200 days. Biochemical and meat quality characteristics were also affected, although these effects depended on both muscle and sex. In summary, a lower gestational pasture allowance negatively affected fetal myogenesis and neonatal muscle characteristics (worse hypertrophic capacities), and induced fetal programming effects on muscle mass and muscle characteristics at 200 days. This implies that, regardless of postnatal conditions, intrauterine alterations induce muscular changes, which may be related to the ability to grow and the quality of the meat produced. Likewise, our results highlight the importance of considering the sex of the animal and the muscle when studying these effects.

**Keywords:** myogenesis, fetal programming, muscle fiber types, meat quality.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El concepto “programación fetal” se refiere a los cambios permanentes que se generan sobre diversos aspectos de los individuos y que tienen su origen en perturbaciones ambientales acontecidas durante las etapas críticas de su desarrollo temprano. A pesar de que muchos factores son capaces de ejercer efectos de programación fetal, la nutrición de las madres gestantes es considerado uno de los factores más relevantes. Su influencia es especialmente importante en aquellas especies y/o sistemas productivos en los que los períodos de subnutrición son frecuentes debido a la dependencia de factores climáticos u otros factores ambientales, como es el caso de los rumiantes en pastoreo. Más aun, los efectos de la subnutrición prenatal pueden ser especialmente relevantes para algunos tejidos u órganos en particular. En ese sentido, el tejido muscular esquelético, que constituye el principal componente de las piezas de carne, es especialmente sensible a los efectos de la programación fetal. Esto se debe a que fija algunas de sus características definitivas muy temprano durante el desarrollo y a que posee una relativa baja prioridad en la partición de nutrientes durante su desarrollo. Por ende, es posible especular con que un descenso en la disponibilidad forrajera durante la gestación derive en períodos de subnutrición embrionaria-fetal repercutiendo en el desarrollo muscular y afectando la productividad (tanto en términos de cantidad como de calidad) de carne de los corderos.

La cadena cárnica ovina ocupa un lugar importante en la economía uruguaya. En el año 2021 las exportaciones de carne ovina desde el Uruguay alcanzaron cifras récord con un valor exportado total de 124 millones de dólares. A pesar de que la ovinocultura nacional ha avanzado en estrategias para terminar corderos pesados, la cría ovina uruguaya es mayoritariamente extensiva, sobre campo natural y suelos marginales (Piaggio, 2014). Por lo tanto, dada la variabilidad estacional de la producción de pasturas del campo natural (Berretta et al., 1994), la estacionalidad reproductiva y la duración de la gestación ovina, es esperable que las ovejas gestantes experimenten períodos de subnutrición durante la crisis invernal del campo natural, comprometiendo el desarrollo fetal y “programando”, así, la potencialidad

productiva de los futuros corderos. Más aun, esta problemática trasciende a los sistemas productivos uruguayos y de hecho ha sido planteada como un problema recurrente en la mayoría de los sistemas que involucran rumiantes en pastoreo. De acuerdo con lo revisado por Wu et al. (2006), dada la baja calidad nutricional de las pasturas, particularmente durante las estaciones frías o secas, es muy factible que las ovejas gestantes experimenten períodos de subnutrición que comprometan el desarrollo de su progenie. Estos autores plantean, por ejemplo, que en los sistemas extensivos de los Estados Unidos, las ovejas gestantes que pastorean sin suplementación pueden experimentar pérdidas de peso y condición corporal importantes, lo cual se asocia con el hecho de que durante el invierno el contenido de proteína metabolizable en las pasturas cae sensiblemente (frecuentemente por debajo del 8 %) y se suma, además, a que las ovejas (dada su estacionalidad reproductiva) suelen aparearse en el otoño tardío o inicio del invierno, por lo que gran parte de su gestación ocurre durante la estación del año en la cual el aporte nutricional de las pasturas es menor.

Por lo expuesto anteriormente, en la presente tesis nos propusimos indagar sobre los efectos de una subnutrición gestacional inducida por una menor oferta de forraje de campo natural asignada a ovejas gestantes sobre el desarrollo muscular y la potencialidad de su progenie para producir carne en cantidad y en calidad adecuada.

## **1.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La oferta de forraje de campo natural durante la gestación afecta el desarrollo y la diferenciación muscular en los principales músculos de la canal de fetos ovinos de 70 días de desarrollo y corderos neonatos, y se perpetúa en el tiempo alterando las capacidades de crecimiento, el desempeño productivo, la calidad de la canal, la composición fibrilar y la calidad de la carne en los principales músculos de la canal de corderos en edad de faena.

Asimismo, los efectos de la oferta de forraje sobre la composición muscular, la capacidad de crecimiento y la calidad de la canal y de la carne varían dependiendo tanto del músculo evaluado como del sexo del individuo.

## **1.2 OBJETIVO GENERAL**

Aportar conocimiento original acerca del impacto de la oferta de forraje de campo natural en los rebaños de cría sobre el desarrollo muscular y su posible impacto en la cantidad y calidad de carne producida por la progenie.

## **1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar el impacto de la oferta de forraje de campo natural gestacional sobre el desarrollo muscular en fetos ovinos de 70 días de desarrollo.
- Evaluar el impacto de la oferta de forraje de campo natural gestacional sobre el desarrollo muscular en corderos neonatos.
- Evaluar el impacto de la oferta de forraje de campo natural gestacional sobre el crecimiento, el desempeño productivo y la calidad de la canal en corderos pesados machos y hembras.
- Evaluar el impacto de la oferta de forraje de campo natural gestacional sobre las características musculares y la calidad de la carne en corderos pesados machos y hembras.

## **1.4 ESTRUCTURA GENERAL DE LA TESIS**

La estructura general de la presente tesis incluye un primer capítulo introductorio donde se presenta una revisión bibliográfica exhaustiva de la literatura científica relacionada con la propuesta y luego se presentan los experimentos, los resultados y su discusión organizados en 4 capítulos consecutivos que se corresponden con 4 artículos científicos.

En el capítulo 2 se presentan los efectos de la oferta de forraje gestacional sobre el desarrollo muscular en fetos ovinos.

- Maternal undernutrition affects secondary myogenesis in a muscle dependent way across the major muscles of 70-day old ovine fetuses. Ithurralde, J., Genovese, P., Abud, M. J., López-Pérez, Á., Pérez-Clariget, R., & Bielli, A. (2020). *Small Ruminant Research*, 191, 106174.

En el capítulo 3 se presentan los efectos de la oferta de forraje gestacional sobre el desarrollo muscular en corderos neonatos.

- Maternal undernutrition induced by a lower natural pasture allowance affects muscle characteristics in newborn lambs. Ithurralde, J., Pérez-Clariget, R., Abud, M. J., Álvarez-Oxiley, A., Casal, A., Astessiano, A. L., & Bielli, A. (2022). Artículo enviado a una revista internacional arbitrada.

En los capítulos 4 y 5 se presentan los efectos de la oferta de forraje gestacional sobre el desarrollo, el desempeño productivo y la calidad de la canal de corderos machos y hembras y sobre la composición muscular y la calidad de la carne de corderos machos y hembras.

- Sex-dependent effects of maternal undernutrition on growth performance, carcass characteristics and meat quality of lambs. Ithurralde, J., Pérez-Clariget, R., Corrales, F., Fila, D., López-Pérez, Á., de Jesús Marichal, M., Saadoun, A., & Bielli, A. (2019). *Livestock Science*, 221, 105-114.
- Gestational nutrient restriction under extensive grazing conditions: Effects on muscle characteristics and meat quality in heavy lambs. Ithurralde, J., Pérez-Clariget, R., Saadoun, A., Genovese, P., Cabrera, C., López, Y., Feed, O., & Bielli, A. (2021). *Meat Science*, 179, 108532.

Finalmente en el capítulo 6 se presenta una discusión general de los resultados reportados en los capítulos anteriores.

## **1.5 MARCO TEÓRICO**

### **1.5.1 El tejido muscular esquelético y la diversidad fibrilar. Importancia para la producción animal y la calidad de la carne**

Los músculos esqueléticos son los principales componentes de la carne. La composición de los músculos esqueléticos es heterogénea e involucra la presencia de diversos tipos de tejidos: conjuntivos más o menos laxos (tejidos conjuntivos intramusculares), vasos sanguíneos, nervios y tejido adiposo, además del tejido muscular esquelético propiamente dicho. Las células (fibras) musculares estriadas esqueléticas ocupan entre el 75 y el 90 % del volumen muscular, constituyen el tejido contráctil y sus características definen la masa muscular y la potencialidad productiva de carne de los animales (Lee et al., 2010), a la vez que también afectan de forma sustancial los atributos de calidad de la carne producida (Klont et al., 1998). Las fibras musculares estriadas esqueléticas son células altamente especializadas: sincitios multinucleados de gran tamaño (diámetro y longitud) muy diferenciados y especializados para el trabajo mecánico contráctil. No obstante, existen importantes diferencias morfológicas y funcionales entre las poblaciones de fibras que componen los músculos. Actualmente, las fibras musculares estriadas esqueléticas se clasifican según dos grandes criterios: sus características contráctiles y sus características metabólicas (Lefaucheur y Gerrard, 2000). El tipo contráctil se refiere al nivel de adaptación que posee la célula para desarrollar contracciones más o menos veloces y está definido por el polimorfismo de la cadena pesada de miosina (MyHC) (Maccatrozzo et al., 2004). De esa forma, las llamadas fibras de contracción lenta contienen MyHC de tipo I y están fisiológicamente asociadas a funciones de mantenimiento de la postura que exigen contracciones lentas y prolongadas, mientras que las fibras de contracción rápida contienen MyHC de tipo II y se encuentran especializadas en la producción de movimientos más breves e intensos (Lefaucheur y Gerrard, 2000). Nueve isoformas de MyHC se han identificado en los músculos de mamíferos (Schiaffino y Reggiani, 1996). Las isoformas de MyHC conocidas como

embrionaria y neonatal están vinculadas a etapas prematuras del desarrollo muscular. La isoforma atrial  $\alpha$  o  $\alpha$  cardíaca y las isoformas extraocular (EO) y masticatoria (M) son específicas para algunos músculos particulares, mientras que otras cuatro isoformas se expresan en músculos esqueléticos de mamíferos adultos, y se denominan  $\beta$  lenta o tipo I, IIA, IIB y IIX o D. La velocidad de contracción de las isoformas adultas aumenta en el sentido  $I < IIA < IIX < IIB$  (Schiaffino y Reggiani, 1996). Por su parte, el tipo metabólico fibrilar está definido por el nivel de adaptación que posea una fibra para obtener la energía para la contracción siguiendo un metabolismo predominantemente aeróbico oxidativo u anaeróbico glicolítico. Las fibras oxidativas son aquellas capaces de utilizar tanto glucosa como lípidos para obtener energía y que muestran un claro predominio de la actividad aeróbica; las fibras glicolíticas poseen mayores reservas de glucógeno y mayor potencialidad anaeróbica, y las intermedias presentan ambas características sin mostrar predominio claro por una u otra ruta metabólica (Ashmore y Doerr, 1971, Fazarinc et al., 1995, Ruusunen y Puolanne, 1997, Graziotti et al., 2000).

Por otra parte, los tipos fibrilares no solamente se diferencian en cuanto a sus características contráctiles y metabólicas, sino que también presentan otro conjunto de importantes diferencias fisiológicas y morfológicas. Estas involucran, por ejemplo, diferencias en el desarrollo del retículo sarcoplásmico, en la actividad ATPásica, en el nivel de vascularización, en el diámetro o tamaño fibrilar, en el número y tamaño de mitocondrias, en el contenido de lípidos y mioglobina, en la capacidad *buffer* (amortiguadora) y en la resistencia a la fatiga (Lefaucheur, 2010). Además, las fibras musculares también muestran diferencias importantes en aspectos vinculados al metabolismo y a la capacidad de respuesta del tejido muscular ante determinados eventos fisiológicos. Por ejemplo, las fibras tipo I se consideran más receptivas a la insulina, exhiben mayor capacidad de unión a la hormona, así como también mayor actividad de su receptor específico (Bonen et al., 1981, Megeney et al., 1993), muestran mayores niveles de GLUT 4 (Kern et al., 1990), mayor capacidad de captación de glucosa (Bonen et al., 1981) y mayor número de receptores insulínicos (Lefaucheur et al., 1986). A su vez, los diferentes tipos de fibras también difieren en aspectos relacionados al contenido lipídico muscular. El

nivel de triacilglicéridos es elevado en las fibras tipo I, intermedio en las tipo IIA y bajo en las IIB (Essén-Gustavsson et al., 1994, Malenfant et al., 2001). Por otra parte, el contenido de fosfolípidos es un 30 % más elevado en los músculos predominantemente constituidos por fibras tipo I con respecto a aquellos que contienen más fibras de tipo II (Leseigneur-Meynier y Gandemer, 1991, Alasnier et al., 1996).

Normalmente se acepta que el predominio de uno u otro tipo fibrilar es capaz de incidir en las diferencias observables en diferentes atributos de calidad de carne tales como el color, la capacidad de retención de agua, la terneza o la aceptabilidad sensorial (Klont et al., 1998, Lefaucheur, 2010, Picard y Gagaoua, 2020). El modo cómo los tipos fibrilares afectan la calidad de la carne involucra diversos aspectos y depende del atributo de calidad al que nos estemos refiriendo. Las diferencias fibrilares pueden incidir en diversos atributos de calidad al afectar la cinética del pH muscular *postmortem*, principalmente debido a las diferencias que exhiben las fibras en las capacidades para acumular glucógeno y degradarlo, así como también en las capacidades para regenerar ATP a partir de creatina fosfato previo al inicio de la glucólisis (Poso y Puolanne, 2005). El grado y la velocidad de descenso *post mortem* del pH muscular afectan diversas características de la calidad de la carne tales como el color, la capacidad de retención de agua o la terneza (Monin, 1988; Thomsen y Zeuthen, 1988; Huff-Lonergan y Lonergan, 1999). A su vez, el color de la carne es afectado por la composición fibrilar a través de las diferencias entre los tipos de fibras en el contenido de mioglobina, de forma tal que un aumento en la proporción de fibras lentas y oxidativas mejora la aceptabilidad en términos de color de la carne al aumentar el nivel de rojo (Henckel et al., 1997, Ithurralde et al., 2018). Más aun, los tipos fibrilares pueden incidir también de forma importante en el color de la carne y especialmente en su luminosidad a través de diferencias estructurales en las propias células musculares. De acuerdo a lo revisado por Purslow et al. (2020), las diferencias en la disposición espacial de las miofibrillas, el espacio entre miofilamentos dentro de las miofibrillas, el diámetro de las miofibrillas, el diámetro de la célula muscular y las diferencias en la longitud de los sarcómeros y en la distribución de diversas proteínas sarcoplásmicas pueden afectar la dispersión de la

luz de la carne y, por ende, repercutir en su luminosidad. Por otra parte, la terneza, propiedad física más importante de la carne cuando esta es consumida tras cierto grado de cocción, también puede ser afectada por la diversidad fibrilar a través de diversos mecanismos. Dichos mecanismos incluyen la susceptibilidad al acortamiento sarcomérico durante el *rigor mortis* (Hertzman et al., 1993, Huff-Lonergan et al., 2010), la actividad proteolítica *post mortem* durante la maduración (Ouali y Talmant, 1990, Singh et al., 1997, Sazili et al., 2005) o la influencia morfológica/estructural de los tipos fibrilares (Maltn et al., 1997, Ithurrealde et al., 2018).

Finalmente, también es importante resaltar que los tipos fibrilares, además de afectar la calidad de la carne, también son considerados un factor relevante sobre las capacidades de crecimiento de los animales, las cuales repercuten en el desempeño de estos en los diferentes sistemas productivos. La base de este concepto está fundada en que, en general, las fibras rápidas y glicolíticas presentan mayores diámetros promedio en los animales productivos y por ello se ha establecido que un aumento en la cantidad de fibras rápidas y glicolíticas podría favorecer la masa muscular total (Lefaucheur y Gerrard, 2000). De acuerdo con Lefaucheur (2010), las fibras rápidas y glicolíticas poseen comparativamente una mayor capacidad hipertrófica posnatal en relación con las fibras lentas. Esta relación positiva entre las fibras rápidas y glicolíticas y la masa muscular es particularmente evidente cuando se compara animales de diferentes genotipos o bien cuando, en el caso de los cerdos, se compara animales domésticos con animales salvajes (Weiler et al., 1995). Comparando dos razas ovinas contrastantes en términos de rusticidad y capacidad de crecimiento (Scottish blackface y Texel) se reportó que los músculos de los animales Texel (menos rústicos y con mejor aptitud carnicera) presentan más fibras rápidas y glicolíticas que se asocian positivamente con mayor desarrollo muscular (Bünger et al., 2009).

En síntesis, podemos decir que la diversidad fibrilar es un factor clave a considerar en los animales productores de carne, ya que puede incidir marcadamente tanto sobre las capacidades de crecimiento y la masa muscular, como también sobre diferentes atributos de la calidad final del producto.

## **1.5.2 Miogénesis en los animales de producción**

### **1.5.2.1 Proceso básico de formación de las fibras musculares**

Las células musculares se originan a partir de precursores miogénicos conocidos como mioblastos que atraviesan una serie de etapas que involucran la proliferación, la fusión para formar miotubos y, luego, la diferenciación a células maduras (Gerrard y Grant 2003, Zammit et al., 2006). Los mioblastos derivan de células mesenquimales indiferenciadas pluripotenciales (Pittenger et al., 1999) y surgen en el embrión a partir del mesodermo, más precisamente del dermomiótomo somítico (Picard et al., 2002). La porción dorso medial del dermomiótomo origina a los músculos paravertebrales y de las extremidades, la porción ventro lateral del dermomiótomo origina a los músculos torácicos, mientras que los músculos cráneo faciales derivan de los somites rostro occipitales y cefálicos (Soussi-Yanicostas, 1991). Los precursores miogénicos todavía indiferenciados migran desde los somites alentados por estímulos que se producen en el tubo neural y en la notocorda, y una vez comprometidos hacia la línea miogénica, comienzan con la sucesión de pasos que los llevan a la formación de células musculares maduras (Picard et al., 2002). La primera etapa que debe atravesar un mioblasto determinado en la formación de células musculares es la de proliferación mitótica. Una vez que los mioblastos cesan sus ciclos de división celular se disponen a fusionarse entre sí para formar células multinucleadas que dan origen a las fibras musculares esqueléticas. Finalizada la fusión, los mioblastos experimentan una rápida síntesis coordinada de proteínas miofibrilares (Devlin y Emerson, 1979). En ese momento, la densidad ribosómica de los mioblastos desciende notablemente como consecuencia de la acumulación de proteínas intracelulares, lo cual determina un marcado descenso en la basofilia celular (Swatland, 1984). La presencia de polirribosomas (Allen y Pepe, 1965), la síntesis de la enzima creatina fosfoquinasa (Keller y Nameroff, 1974), así como el incremento masivo en la cantidad de mitocondrias y ADN mitocondrial (Brunk, 1981), son sucesos característicos de la elevada actividad metabólica que precede a la fusión de los mioblastos. Esta se inicia en un solo punto entre dos células,

formándose un poro que aumenta de tamaño hasta no dejar vestigio alguno de las membranas que intervienen en la fusión (Lipton y Koningsberg, 1972). Una vez producida la fusión, es irreversible (Knudsen y Horwitz, 1977), y rápidamente se inicia la formación de las miofibrillas intracelulares, las cuales van progresivamente acumulándose por debajo de la membrana del nuevo sincitio celular. En este proceso, los mioblastos fusionados pierden definitivamente su capacidad mitótica y los elementos celulares que derivan de la fusión de mioblastos pasan a denominarse miotubos debido a que su estructura es básicamente la de un cilindro hueco de miofibrillas (Swatland, 1984).

#### **1.5.2.2 Diferentes generaciones de precursores fibrilares. Miogénesis bifásica en los animales productivos**

En la mayoría de los mamíferos y animales productivos la miogénesis es un proceso bifásico (Lefaucheur y Gerrard, 2000). Esto implica que la formación de los elementos posmitóticos multinucleados se da en dos grandes fases temporalmente distintas. La primera oleada de formación de miotubos proviene de mioblastos embrionarios que forman los llamados miotubos primarios, mientras que la segunda oleada deriva de mioblastos fetales y da origen a las llamadas fibras fetales secundarias (Fig. 1; Picard et al., 2002). La razón para las diferentes denominaciones que reciben estos tipos celulares (miotubos primarios y fibras secundarias) responde a motivos morfológicos, dado que, a diferencia de los miotubos, las fibras secundarias, tras su formación, disponen sus miofibrillas en el centro celular, desplazando los núcleos hacia la periferia, lo que les quita ese aspecto de cilindro hueco que es característico de los miotubos antes formados. Cada fibra fetal secundaria se forma alrededor de un miotubo primario formado previamente a partir de mioblastos fetales que se alinean sobre los miotubos primarios (Picard et al., 2002). De esta forma, los miotubos primarios dan origen a la citoarquitectura básica muscular, al tiempo que las fibras fetales secundarias los utilizan como una especie de andamio o guía para la formación masiva de nuevas fibras (Swatland, 1984, Lefaucheur y Gerrard, 2000). En todas las especies productivas los miotubos primarios representan una proporción muy limitada de las células de los músculos

maduros, mientras que las fibras fetales secundarias constituyen la mayoría de las fibras maduras (McLennan, 1994). El número de fibras fetales secundarias que se forman alrededor de cada miotubo primario varía de 5 a 9 en roedores de laboratorio (Ross et al., 1987, Ontell et al., 1988) y hasta casi 20 en especies productivas como el cerdo (Stickland y Handel, 1986). La cinética en la aparición o formación de estas dos generaciones de precursores fibrilares varía dependiendo de las especies, pero es importante destacar que en las principales especies productivas (suinos, bovinos y ovinos) el período de formación de las fibras fetales secundarias (fase hiperplásica miogénica) termina muy temprano durante el desarrollo intrauterino. En los suinos, una primera generación de miotubos primarios se forma entre los días 35 y 55 de gestación, seguida por la formación de fibras fetales secundarias entre los días 55 y 95 (Lefaucheur y Gerrard, 2000). En los ovinos, los miotubos primarios se forman entre los días 32 y 38 de gestación, mientras que las fibras fetales secundarias se forman entre los días 38 y 76 de gestación (Wilson et al., 1992). En los bovinos, los miotubos primarios aparecen en torno al día 60 de gestación y las fibras fetales secundarias terminan de formarse aproximadamente al día 110 de gestación (Gagnière et al., 1999).

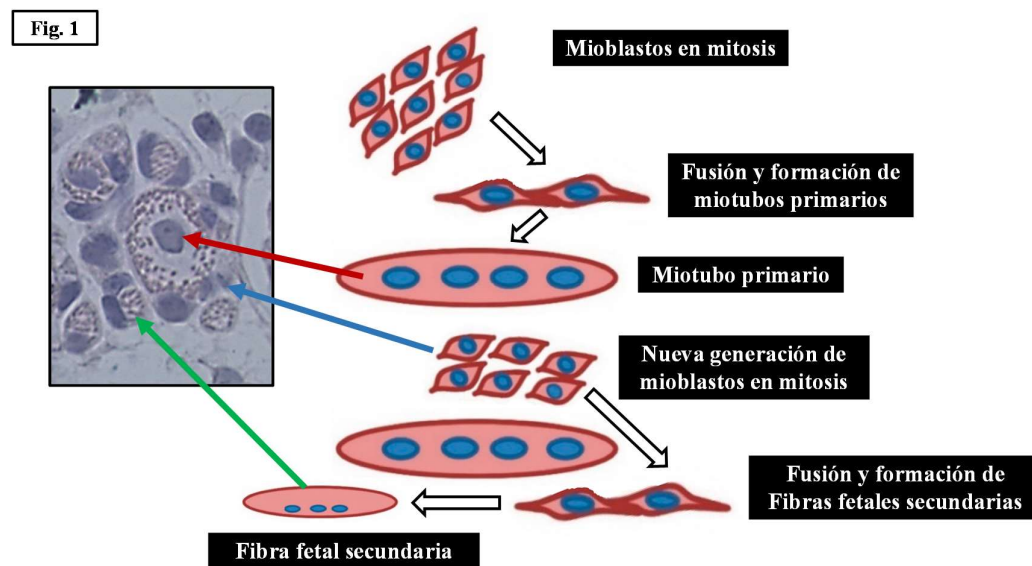


**Figura 1:**

Representación esquemática del proceso bifásico de formación de precursores fibrilares. El esquema se acompaña de una imagen histológica de un fascículo muscular en desarrollo en un feto ovino de 70 días. Allí se puede distinguir un miotubo primario (línea roja) de gran diámetro con su núcleo basófilo en posición central, rodeado de miofibrillas eosinófilas en posición periférica. Se distinguen, a su vez, núcleos de nuevos mioblastos ubicados en la periferia del miotubo (línea celeste), así como también fibras fetales secundarias formadas alrededor del miotubo (línea verde), caracterizadas por presentar un menor diámetro, núcleos en posición periférica y su sarcoplasma ocupado por miofibrillas eosinófilas.

**1.5.2.3 Regulación de la miogénesis prenatal**

Como acabamos de ver, y se ejemplifica en la Fig. 2, la miogénesis puede resumirse como una sucesión ordenada de etapas que va desde el compromiso (determinación) de una célula pluripotencial hacia la línea miogénica hasta su diferenciación a una fibra madura. Toda esa sucesión de pasos está regulada por numerosos factores que se expresan en las diferentes etapas siguiendo un orden espacial y temporal (Wigmore y Dunglison, 2002). En primer lugar, la determinación de las células mesenquimales hacia la línea miogénica está asociada a la expresión de los factores PAX 3 y PAX 7. Los genes de la familia PAX codifican para factores de transcripción que se caracterizan por la presencia de una pareja de dominios, un octapéptido y un homeodominio que les permite unirse específicamente al ADN (Lang et al., 2007). Las proteínas PAX juegan un rol decisivo en las etapas tempranas del desarrollo de diferentes tipos celulares y tejidos, promoviendo la expresión de genes que son específicos para los diferentes tipos celulares en desarrollo (Buckingham y Relaix, 2007). El rol que desempeñan los factores PAX 3 y 7 en la miogénesis es similar al que desarrollan otros factores de la familia PAX en el desarrollo de otros tejidos, primero conduciendo a las células progenitoras hacia la línea miogénica y luego asegurando su supervivencia (Buckingham y Relaix, 2007). Concretamente, la expresión del factor PAX 7 suele considerarse como un marcador de mioblastos no diferenciados con capacidad mitótica preservada (Zammit et al., 2006). Por otra parte, una vez que las células inician el proceso miogénico aparece la regulación por parte de una familia de factores reguladores miogénicos específicos

(MRF) miembros de la familia bHLH (por su sigla en inglés *basic helix-loop-helix*). Estos factores de transcripción incluyen a las proteínas MYF5, MYOD (MYOD1), MRF4 (MYF6) y miogenina, que se van expresando según un orden secuencial a lo largo del proceso de diferenciación miogénico (Brown, 2014). Durante las etapas tempranas de la miogénesis, los MRF no solamente están involucrados en inducir la expresión de genes específicos, sino que también desempeñan un importante rol en la regulación de la transición de los mioblastos desde la fase proliferativa a la diferenciación; esto implica modular el tiempo que permanece un mioblasto dividiéndose por mitosis antes de abandonar el ciclo celular para fusionarse y detener su aporte a la hiperplasia muscular. Aquí juegan un rol clave los equilibrios en la expresión de los MRF MYOD y MYF5 que derivan en la regulación a la baja de los activadores del ciclo celular como las ciclinas y la regulación al alza de inhibidores del ciclo celular como la proteína del retinoblastoma, p21, p27 y p57 (Kitzmann y Fernandez, 2001). Aparentemente, el hecho de que un mioblasto se mantenga en el ciclo celular o progrese hacia la fusión podría estar asociado a la relación en los niveles de expresión de MYOD y MYF5, de forma tal que los niveles de MYOD son máximos en la fase G1 temprana disminuyendo al momento de la transición G1 a S. La ventana en la cual las células salen del ciclo hacia la diferenciación es la fase G1, período en el que MYOD está en su máximo nivel de expresión y MYF5, en su mínimo nivel. Por lo contrario, los mioblastos en estado quiescente que no se están diferenciando expresarían altos niveles de MYF5 y bajos niveles de MYOD (Kitzmann y Fernandez, 2001). Por otra parte, una vez que los mioblastos cesan con las divisiones mitóticas y pasan a la fase de fusión y diferenciación, los MRF involucrados en la regulación pasan a ser principalmente el MRF4 y la miogenina (Brown, 2014). Específicamente, la expresión de factor miogenina ha sido utilizada como un indicador de mioblastos en proceso de fusión (Barnoy y Kosower, 2007).

**Fig. 2**

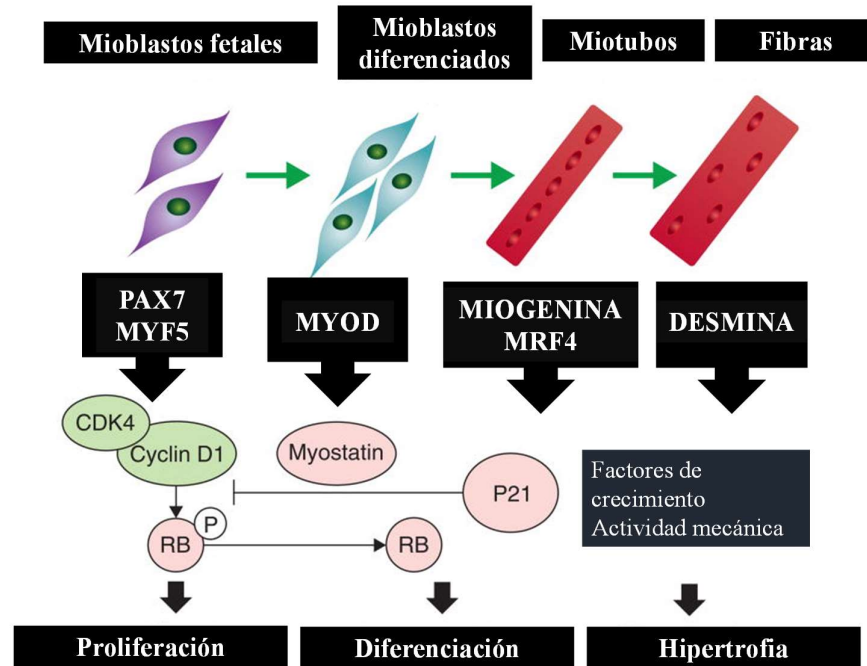


**Figura 2:**

Representación esquemática del proceso de diferenciación de un mioblasto proliferativo a una fibra muscular (modificado de Brown, 2014). El esquema muestra la expresión de los diferentes MRF durante la miogénesis: PAX 7 y MYF5 se expresan en los mioblastos. El pasaje de la fase proliferativa a la diferenciación está marcada por los cambios en la expresión temporal de MYOD, MRF4 y miogenina, al tiempo que la expresión del filamento intermedio desmina caracteriza a las fibras maduras.

El esquema muestra cómo los cambios en la expresión de MRF inducen cambios moleculares que regulan el pasaje de proliferación a fusión y diferenciación mioblástica. La ciclina D1 y CDK4 inducen la proliferación mioblástica al mantener a la proteína del retinoblastoma (RB) en su estado fosforilado e inactivo. Para el pasaje a la diferenciación, el MRF MYOD se une a la miostatina llevando a que el mioblasto abandone el ciclo celular. A su vez, la proteína P21 inhibe a la CDK4 conduciendo a la desfosforilación de la proteína del retinoblastoma, lo que fomenta una reducción en la actividad cíclica celular. Esto lleva a que el mioblasto abandone la mitosis y progrese hacia la fusión expresando el MRF miogenina. La maduración e hipertrofia de las fibras formadas es estimulada luego por diversos factores de crecimiento, así como también por la propia actividad mecánica fibrilar.

#### 1.5.2.4 Crecimiento muscular posnatal

Como se mencionó antes, en las especies productivas el número total de células que componen los músculos queda determinado muy tempranamente durante el desarrollo. No obstante, a diferencia del número de células, el tamaño celular se mantiene casi invariado durante el desarrollo prenatal, pero aumenta dramáticamente durante la vida posnatal. Esto se traduce en que el desarrollo muscular posnatal es esencialmente hipertrófico. La hipertrofia implica un aumento tanto en el diámetro como en la longitud de las fibras formadas prenatalmente y básicamente se deberá a un balance positivo entre la síntesis y la degradación proteica. A pesar de que en general la hipertrofia fibrilar puede simplificarse al nivel de una respuesta al balance neto entre síntesis y degradación proteica, este proceso no es tan sencillo y aparece otra serie de elementos y factores que inciden fuertemente en la capacidad que posee un músculo para experimentar diferentes niveles de hipertrofia posnatal. Uno de estos factores está vinculado con la capacidad nuclear para liderar la síntesis proteica fibrilar. Esto se refiere a que cada núcleo de la fibra muscular posee lo que se conoce como un dominio citoplásmico, sector de citoplasma en el que debe liderar la nueva incorporación de proteínas miofibrilares para favorecer la hipertrofia. Por esta razón, tradicionalmente se acepta que la cantidad de núcleos que posee una fibra tras culminar su formación es un factor clave para la capacidad hipertrofica posnatal (Beermann, 1983). Otro de los factores decisivos sobre la capacidad hipertrofica fibrilar es lo que se conoce como la renovación o el *turnover* celular. Este concepto se refiere a la posibilidad de que los músculos durante su desarrollo posnatal incorporen nuevos núcleos o los pierdan por causa de fenómenos apoptóticos vinculados a la atrofia muscular. Dado que los núcleos de las fibras musculares han perdido su capacidad mitótica temprano en la vida prenatal, la incorporación de nuevos núcleos ocurre necesariamente gracias a la actividad de células que se ubican fuera de la fibras ya formadas. Estas células satélite son los principales donantes de nuevos núcleos para la hipertrofia posnatal; se trata de células miogénicas que permanecen en estado quiescente y que participan en el desarrollo posnatal, en la regeneración de tejido muscular tras lesiones y en el aumento de masa muscular debido al ejercicio y a la administración de hormonas y promotores de crecimiento

(Montarras et al., 2013). Los núcleos de las células satélite se ubican en una locación muy peculiar, entre la lámina basal y el sarcolema de las fibras (se ubican por dentro de la lámina basal fibrilar, pero poseen su propio sarcolema) y para su identificación se apela a la microscopía electrónica o bien a la inmunolocalización de proteínas específicas (Blaauw y Reggiani, 2014). De hecho, dado que las células satélite podrían considerarse como mioblastos indiferenciados que preservan su capacidad mitótica más allá de la vida prenatal, suelen identificarse mediante la expresión de la proteína PAX 7 (Yin et al., 2013). Las células satélite contribuyen al desarrollo muscular temprano proveyendo nuevos núcleos a las células ya formadas. En los músculos neonatales las células satélite pueden representar hasta el 30 % de todos los núcleos y van decreciendo en número durante las primeras etapas del desarrollo posnatal a medida que los núcleos fibrilares aumentan (Schultz, 1996, White et al., 2010). Al mismo tiempo, durante estas primeras etapas del desarrollo posnatal, el balance entre la cantidad de núcleos incorporados desde las células satélite y el aumento en el volumen celular favorece el potencial hipertrófico fibrilar. Esto ocurre porque al principio son más los nuevos núcleos incorporados que el aumento que se produce en el volumen celular, de forma tal que más núcleos pasan a tener un área citoplásmica menor para gobernar, potenciándose de ese modo la capacidad hipertrófica global (Blaauw y Reggiani, 2014). A su vez, tanto durante el desarrollo posnatal temprano como durante la hipertrofia en la vida adulta las células satélite se activan y desarrollan una cascada de eventos similares a los que experimentan los mioblastos durante la miogénesis prenatal. Es decir que en respuesta a diferentes estímulos se dividen por mitosis para luego diferenciarse y fusionarse a las células formadas. Las células satélite quiescentes expresan la proteína PAX 7 (Seale et al., 2000), cuando se activan coexpresan PAX 7 y MYOD (Zammit et al., 2002), y luego proliferan, reducen su expresión de PAX 7 y se diferencian para fusionarse, momento en el que expresan (al igual que los mioblastos prenatales) el MRF miogenina (Zammit et al., 2006). A su vez, otra subpoblación de células satélite que proliferaron mantienen su expresión de PAX 7 al tiempo que regulan a la baja su expresión de MYOD, saliendo del ciclo celular pero sin alcanzar la diferenciación completa, de forma tal que retornan al estado quiescente y permanecen como reserva

miogénica para el futuro (Zammit et al., 2004, Nagata et al., 2006). Todo el proceso miogénico posnatal está sometido a un importante control por parte de una serie de factores de crecimiento y hormonas (Florini et al., 1991). De los diversos factores y hormonas involucradas, el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) parece ser de los más relevantes al vincularse a la modulación en la expresión de un variado espectro de proteínas involucradas en las diferentes etapas miogénicas (Florini, 1987, Florini et al., 1991). De hecho, de acuerdo con Mavalli et al. (2010) en lo que respecta a la miogénesis, la principal acción de la hormona de crecimiento (GH) adenohipofisaria consiste en estimular la producción local de IGF-1 por parte de los mioblastos. A su vez, a partir de estudios realizados en roedores de laboratorio, se ha reportado que, para el caso del desarrollo muscular, la propia producción local de IGF-1 muscular ejerce un efecto comparablemente mayor al del IGF-1 circulante, mayoritariamente de síntesis hepática (Philippou et al., 2007, Clemmons, 2009). Los efectos del IGF-1 son mediados a través de su receptor específico, IGFR1, cuya activación se traduce en estímulos a la proliferación celular e inhibición de la apoptosis (LeRoith, 2000). Por otra parte, existen 6 proteínas de unión a los IGF (IGFBP 1-6) capaces de unirse tanto al IGF-1 como al IGF-2 (Velloso, 2008). En términos generales, las IGFBP se combinan con el IGF-1 aumentando su vida media en sangre y modulando su acción tisular. Sin embargo, los efectos que ejercen las IGFBP sobre el desarrollo muscular no están del todo dilucidados. El IGF-1 posee en general una serie de efectos de tipo anabólico sobre el desarrollo muscular que han sido demostrados tanto *in vivo* como en modelos *in vitro* de cultivos celulares (Florini, 1987, Florini et al., 1991). El IGF-1 es capaz de estimular tanto la proliferación como la fusión de las células satélite en cultivos celulares (Allen y Boxhorn, 1989), a la vez que ha demostrado ser capaz de aumentar el número de núcleos y el tamaño fibrilar en cultivos celulares (Vandeburgh et al., 1991). Asimismo, se ha demostrado que el nivel de IGF-1 se correlaciona positivamente con el aumento en el contenido de DNA muscular durante los procesos de hipertrofia posnatales, lo que sugiere fuertemente que el IGF-1 desempeñaría un rol clave en los procesos de hipertrofia mediados por la activación y proliferación de las células satélite (Adams y Haddad, 1996).

#### **1.5.2.5 Diferenciación metabólica y contráctil fibrilar**

Como se comentó antes, las poblaciones celulares que componen el tejido muscular estriado esquelético son diversas. Por dicha razón, es necesario que durante el proceso miogénico estas células en formación se diferencien y adquieran sus características morfológicas y fisiológicas definitivas. La diferenciación fibrilar puede dividirse en la adquisición de las dos características funcionales más importantes: la diferenciación contráctil y la diferenciación metabólica. La diferenciación contráctil implica la adquisición del tipo maduro de MyHC y suele lograrse paulatinamente, de forma tal que las fibras en formación van cambiando el tipo MyHC que se va expresando conforme avanzan en su desarrollo (Picard et al., 2002). Hasta el nacimiento, tanto las fibras fetales secundarias como los miotubos primarios expresan las isoformas prenatales de MyHC (embrionaria, fetal y  $\alpha$ -cardíaca), las cuales van siendo reemplazadas de forma progresiva por las isoformas adultas de MyHC. Un primer aspecto interesante es que, a diferencia de las fibras fetales secundarias, que recién comienzan a expresar isoformas adultas de MyHC al final de la gestación, la mayoría de los miotubos primarios expresan la isoforma lenta de MyHC tipo I de forma muy temprana durante el desarrollo (Cho et al., 1994). El proceso de diferenciación contráctil fibrilar ha sido revisado tanto en bovinos como en suinos por Picard et al. (2002) y Lefaucheur y Gerrard (2000), respectivamente. En ambas especies, los primeros precursores fibrilares en formarse, los miotubos primarios, primero expresan varias isoformas de MyHC, incluidas no solo las prenatales (embrionaria, fetal y  $\alpha$ -cardíaca), sino también las isoformas maduras lenta y rápida. No obstante, para el día 180 de gestación en los bovinos ya todos los miotubos primarios expresan exclusivamente la isoforma lenta, situación que se extiende hasta el nacimiento y deriva en que la mayoría de estos miotubos primarios dan lugar a fibras que expresan MyHC tipo I durante la vida posnatal. Esta situación cambia, sin embargo, para el caso de los músculos extremadamente rápidos y glicolíticos, en los cuales parte de estos miotubos primarios que al nacer expresan MyHC tipo I podrían cambiar su isoforma de miosina hacia la isoforma rápida de tipo IIC (Picard et al., 1996). Algo similar se ha descrito para los suinos, donde los miotubos primarios también derivan en la formación de fibras lentas maduras con la

excepción de músculos rápidos y glicolíticos como el *semitendinosus* donde algunos miotubos primarios pueden derivar en fibras maduras que expresen la isoforma de MyHC IIA (Lefaucheur et al., 1995). Las fibras fetales secundarias, por su parte, también expresan inicialmente las isoformas prenatales (embrionaria, fetal y  $\alpha$ -cardíaca) y las isoformas maduras lenta y rápida. Sin embargo, para el día 180 de gestación las fibras fetales secundarias continúan expresando las isoformas prenatales y la isoforma madura rápida (tipo II), pero no la isoforma lenta. Para cuando ocurre el nacimiento, conforme la expresión de las isoformas prenatales va disminuyendo y siendo sustituida por las isoformas maduras rápidas, estas fibras terminan originando fundamentalmente fibras maduras rápidas que expresan las isoformas IIB, IIA y IIX (Picard et al., 2002). En los suinos ocurre la particularidad de que si bien las fibras fetales secundarias terminan originando a la mayoría de las fibras rápidas, algunas de ellas ubicadas en la cercanía de las fibras lentas comienzan a expresar la isoforma I muy cerca del nacimiento, pudiendo madurar a fibras de tipo I y expresando a la isoforma  $\alpha$ -cardíaca en la transición entre estas isoformas (Lefaucheur y Gerrard, 2000). Por otra parte, en cuanto a la evolución en la expresión de los subtipos de MyHC rápidos, se ha observado que mientras que la isoforma IIA aparece en las fibras secundarias durante la vida fetal, las isoformas IIX y IIB aparecen recién inmediatamente después del nacimiento (Chang et al., 1995, Chang y Fernandes, 1997). El momento del desarrollo en el cual dejan de expresarse las isoformas prenatales ha sido propuesto como una forma de estimar el grado de madurez miogénico relativo que poseen las diferentes especies (Lefaucheur y Gerrard, 2000). De ese modo, estos autores han propuesto que tanto los bovinos como los ovinos, en los que las isoformas prenatales dejan de expresarse entre los días 180 de vida prenatal a 21 de vida posnatal y 140 de vida prenatal a 28 de vida posnatal, respectivamente, serían especies con un mayor nivel de madurez miogénico al nacimiento si se los compara con los suinos o los conejos, en los que las isoformas prenatales desaparecen entre los días 0 a 15 de vida posnatal o 0 a 56 días de vida posnatal, respectivamente (Picard et al., 2002).

Por otra parte, durante el desarrollo las fibras también deben diferenciarse desde el punto de vista metabólico. En este caso, también existen diferencias

importantes entre especies que están relacionadas con el grado de madurez relativo que poseen cada una de ellas al nacimiento. En los suinos los cambios metabólicos se inician luego del nacimiento con un aumento progresivo en la capacidad glicolítica a medida que el animal crece y que se caracteriza por un incremento muy marcado inicial hasta la tercera semana de vida y luego por un ascenso más paulatino aunque sostenido hasta los 100 kg de peso vivo (Lefaucheur y Gerrard, 2000). Del mismo modo, los suinos experimentan un leve aumento oxidativo durante las primeras semanas de vida posnatal que es seguido por una reducción en la capacidad oxidativa fibrilar hasta la edad de faena. En los bovinos, sin embargo, los cambios metabólicos se inician antes del nacimiento durante el último tercio de gestación. La actividad glicolítica aumenta a medida que avanza la edad, en general, y los músculos de los bovinos van luego perdiendo capacidad oxidativa de forma progresiva desde el nacimiento hasta la pubertad (Jurie et al, 1995).

### **1.5.3 Programación fetal y su efecto sobre el desarrollo muscular y la producción de carne**

#### **1.5.3.1 Origen del concepto e importancia para la producción animal**

El término programación fetal se refiere a las consecuencias permanentes o a largo plazo que surgen de las perturbaciones que acontecen durante los períodos críticos del desarrollo (Desai y Hales, 1997). Los trabajos fundacionales en el tema de programación fetal fueron desarrollados por David Barker, quien estableció una asociación epidemiológica entre el bajo peso al nacer y un elevado riesgo de padecer síndrome metabólico y trastornos cardiovasculares durante la vida adulta en humanos (Barker, 1995). A partir de allí, se ha demostrado que una variada gama de factores a los que se exponen los animales, incluido el ser humano, durante su desarrollo temprano pueden inducir efectos de programación fetal. Estos factores incluyen tanto la sobre como la subnutrición maternas, así como también el estrés, los trastornos mentales maternos o el consumo de diversas drogas o sustancias durante la gestación (Stevenson et al., 2020). A pesar de que los mecanismos implicados en la programación fetal son variados y complejos, en general se acepta que los estresores

prenatales modifican las rutas fisiológicas con la finalidad de proveer al individuo de mejores posibilidades para sobrevivir bajo condiciones ambientales negativas. De hecho, el propio Barker propuso que los individuos mal nutridos durante su desarrollo temprano experimentan cambios fisiológicos que los adaptan mejor a las condiciones de mala nutrición, pero que, sin embargo, cuando se enfrentan a buenas condiciones nutricionales en la vida adulta estas adaptaciones los predisponen a padecer enfermedades metabólicas. Esto es lo que se conoce como la teoría del fenotipo ahorrativo; es decir, animales programados para la escasez que padecen trastornos metabólicos al enfrentarse a condiciones ambientales favorables (Hales y Barker, 1992). El concepto de programación fetal que fuera originalmente desarrollado para explicar la incidencia de trastornos de salud en seres humanos ha sido ampliamente extrapolado a la producción animal y, en particular, a la producción de rumiantes. Los rumiantes, particularmente en los sistemas extensivos, están sujetos a importantes variaciones en términos de abundancia y calidad de nutrientes. Factores propios de la naturaleza de los alimentos que consumen (estacionalidad en la producción de pasturas), así como también factores ambientales esporádicos como las sequías suelen resultar en deficiencias forrajeras que pueden inducir déficits nutricionales durante la gestación o el desarrollo temprano de ovinos y bovinos. Por esta razón, varios investigadores a nivel global han indagado en los posibles efectos que puede generar una mala nutrición prenatal sobre el potencial productivo de rumiantes. De ese modo, se ha demostrado, por ejemplo, que en los ovinos una subnutrición durante el desarrollo temprano es capaz de reducir la tasa ovulatoria de las crías (Rae et al., 2002), alterar el desarrollo testicular (Bielli et al., 2002) y comprometer la producción de lana (Kelly et al., 2006). En los animales productores de carne existen, a su vez, una serie de particularidades que resaltan la relevancia de la programación fetal. En primer lugar, se destaca el hecho de que en un animal carnívoros el período intrauterino de su desarrollo representa proporcionalmente una gran parte de su ciclo vital; un cordero pesado en un sistema intensivo puede faenarse con 6 meses de edad, de forma tal que su vida intrauterina (los aproximadamente 5 meses de gestación) representan en torno al 45 % de su ciclo productivo, concebido como el tiempo transcurrido entre la fecundación y la faena.

En segundo lugar, la programación fetal es especialmente relevante para la producción de carne porque el músculo estriado esquelético, que representa el principal objetivo en un animal carnívor, se forma muy tempranamente durante el desarrollo, fija algunas de sus características principales temprano durante la vida prenatal y además es especialmente susceptible al déficit nutricional durante el desarrollo.

#### **1.5.3.2 Programación fetal y priorización de nutrientes: el dilema fetal ante la restricción y sus efectos sobre el desarrollo muscular**

Como se comentó recién, el tejido muscular esquelético es especialmente susceptible a los efectos de programación fetal. Una de las razones que explica esta mayor susceptibilidad está asociada con la existencia de un orden de priorización para la distribución de los nutrientes durante el desarrollo. Esto determina que ante situaciones de escasez de nutrientes los organismos prioricen el desarrollo de algunos órganos o tejidos por sobre otros. Es así que diversos estudios han demostrado cómo ante situaciones adversas durante el desarrollo prenatal como, por ejemplo, la falta de oxígeno, se produce una redistribución en el flujo sanguíneo placentario y fetal que le permiten al feto priorizar el aporte sanguíneo hacia los órganos más relevantes para la supervivencia inmediata. Según Barker y Hanson (2004), los fetos responden a los efectos adversos durante su desarrollo con una redistribución sanguínea que tiene como objetivo proteger al cerebro, pero que a su vez compromete y limita el desarrollo de otros órganos como los riñones y el hígado. De acuerdo con Nathanielsz y Hanson (2003), esto puede interpretarse como un “dilema fetal” que se plantea ante situaciones restrictivas y que implica el sacrificio en el desarrollo de algunos órganos para poder proteger a otros. Los mecanismos que están detrás de esta redistribución son complejos e involucran la acción de hormonas, así como los cambios que experimentan los diferentes órganos en formación en respuesta a sustancias vasoconstrictoras como catecolaminas, arginina, vasopresina y endotelina, así como también a vasodilatadores como el óxido nítrico (Nathanielsz y Hanson, 2003). A su vez, la redistribución sanguínea también está asociada a la presencia de diferentes estructuras vasculares que permiten el *bypass* selectivo de distintas partes

de la circulación placentaria y fetal. Estas estructuras son el foramen oval, el conducto arterioso y los ductos venosos. De acuerdo con Tchirikov et al. (2003), las catecolaminas son capaces de generar comparativamente mayor nivel de vasoconstricción en las venas intrahepáticas que en los ductos venosos, lo que genera que el flujo sanguíneo fetal se redistribuya reduciendo el pasaje de sangre por el hígado y favoreciendo el flujo hacia el sistema nervioso central.

Por otra parte, además de los mecanismos redistributivos del flujo sanguíneo fetal antes descritos, se ha propuesto la existencia de un orden de priorización en la partición de nutrientes durante el desarrollo, que involucra a los diversos órganos y sistemas de los animales. Comparando el efecto de una subnutrición gestacional sobre el peso de diferentes órganos fetales y neonatales en corderos machos, Abud et al. (2020) recientemente demostraron que ante situaciones nutricionales restrictivas durante el desarrollo intrauterino ovino se establece un orden de priorización en el que el sistema nervioso central es el menos afectado, seguido por el corazón y los órganos metabólicos, luego los testículos y, en último lugar, la carcasa y los genitales externos. Esto implica que la carcasa, que contiene los músculos que derivan en carne, está muy poco priorizada ante carencias nutricionales durante el desarrollo y resalta la importancia que tiene la programación fetal por subnutrición para los sistemas productores de carne.

#### **1.5.3.3 Efectos de programación fetal sobre el desarrollo muscular prenatal**

Como se comentó recién, entre otros factores que determinan que el tejido muscular esquelético sea especialmente sensible a la programación fetal, se incluyen: por un lado, su baja prioridad en la partición de nutrientes (Bauman et al., 1982, Close y Pettigrew, 1990, Abud et al., 2020) y sus características estructurales que lo vuelven un tejido muy rico en proteínas y con una masa total porcentualmente muy grande, y, por otro, las particularidades de su desarrollo, principalmente que la fase hiperplásica miogénica se desencadene temprano durante el desarrollo y que más allá de esta no exista la posibilidad de experimentar un aumento neto en la cantidad de células que conforman los músculos (Picard et al., 2002). A su vez, dado el carácter bifásico de la miogénesis y las diferencias temporales que ocurren entre las fases

hiperplásica e hipertrófica del desarrollo muscular prenatal, los efectos que las condiciones ambientales negativas ejercen sobre el tejido muscular esquelético van a depender del momento del desarrollo en el que estos se concentren. De acuerdo con Picard et al. (2002), dado que los miotubos primarios (primera generación de precursores fibrilares que se forman muy tempranamente durante el desarrollo) están principalmente asociados a establecer la arquitectura muscular básica, estos no son especialmente sensibles a los efectos de programación fetal y su cantidad suele estar determinada casi exclusivamente por factores genéticos. No obstante, las fibras fetales secundarias, que darán origen a la mayoría de las células de los músculos adultos, son especialmente sensibles a los efectos ambientales y epigenéticos (mecanismos que regulan la expresión de los genes sin una modificación en la secuencia del ADN) (Picard et al., 2002). Por esta razón, es especialmente interesante evaluar qué ocurre ante condiciones ambientales desfavorables durante los períodos críticos para la formación de estos precursores fibrilares específicos. En ese sentido, algunos trabajos realizados en diferentes especies han comprobado que son las fibras secundarias las que mayormente padecen los efectos de la subnutrición intrauterina. Maxfield et al. (1997) reportaron que la relación entre fibras secundarias y miotubos primarios está aumentada en músculos de fetos ovinos de 61 días que presentaron mayor desarrollo y tamaño fetal inducido por el cocultivo embrionario. También Zhu et al. (2004) reportaron que los fetos de 78 días gestados por ovejas restringidas al 50 % de nutrientes totales muestran menor cantidad de fibras fetales secundarias en el músculo *longissimus*. Por su parte, Quigley et al. (2005) evaluaron el efecto de cambios nutricionales durante la periconcepción (18 días antes hasta 6 días después de la ovulación) sobre el desarrollo muscular de fetos ovinos de 75 días y reportaron que la restricción nutricional redujo la cantidad de fibras fetales secundarias. En suinos, Tilley et al. (2007) compararon el desarrollo fetal en tres etapas diferentes (45, 65 y 100 días de desarrollo) entre fetos grandes y pequeños y reportaron que a los 100 días de desarrollo los fetos pequeños presentan menores cantidades de fibras fetales secundarias en el músculo *longissimus*. Recientemente, Gauvin et al. (2020) alimentaron ovejas gestantes con tres niveles diferentes (sobrenutrición, subnutrición y control) y evaluaron el desarrollo muscular en

diferentes edades fetales. Estos autores reportaron que tanto la sub como la sobre nutrición indujeron menores cantidades de fibras fetales secundarias en el *longissimus* de fetos de 90 días de desarrollo. Por lo tanto, podemos afirmar que existe suficiente evidencia de que las restricciones nutricionales durante la vida intrauterina temprana a media repercuten fundamentalmente sobre la miogénesis secundaria, manifestándose a través de una reducción en la cantidad de fibras fetales secundarias formadas.

#### **1.5.3.4 Efectos sobre la expresión de MRF, la mitosis mioblástica y la regulación del ciclo celular. La base molecular de los efectos de programación fetal sobre la miogénesis**

Está claro que el ambiente uterino prenatal afecta el desarrollo muscular. Sin embargo, los mecanismos de fondo son complejos e involucran cambios en la expresión de diferentes proteínas y factores de regulación específicos. Por esa razón, diversos trabajos se han centrado en evaluar los efectos de programación fetal sobre los niveles de expresión de diferentes factores reguladores miogénicos. La interpretación de estos resultados es compleja dado que existe una gran variabilidad en el momento en el que se evaluaron los efectos (fetos en diferentes momentos del desarrollo, fetos a término o neonatos, experimentos *in vivo* o modelos *in vitro*, etc.), en los músculos evaluados y en la duración, intensidad y momentos en los que se aplicaron los tratamientos. El hecho es que todas estas diferencias son claves si se consideran las diferencias temporales de la miogénesis y que en cada momento un MRF puede estar jugando un rol diferente o afectando a una población celular distinta; por ejemplo, a un mioblasto fetal o a una célula satélite neonatal. Por ende, es muy importante tener en cuenta todos los aspectos antes mencionados a la hora de interpretar de forma conjunta los resultados de los trabajos que se resumen a continuación.

*Efectos sobre la expresión de MRF:* en ovinos, Lie et al. (2015) reportaron que una subnutrición materna durante los períodos de periimplantación (0 a 6 días después de la concepción) y periconcepción (80 días previos hasta 6 días después de la concepción) reducen el nivel de expresión proteica del factor MYF5 a la vez que

aumentan los niveles de expresión de mRNA de los factores MYOD y miogenina en el *quadriceps* de fetos a término, aunque estos aumentos en la expresión génica no se tradujeron en aumentos a nivel proteico. Por su parte, Jennings et al. (2016) evaluaron el efecto del nivel de energía dietario durante la gestación media (85 a 180 días) sobre la expresión de genes vinculados a la miogénesis en el *longissimus* de fetos bovinos de 180 días y demostraron que una dieta baja en energía aumenta la expresión de miogenina, al tiempo que no afecta la expresión de otros MRF, lo que podría indicar un aumento en la diferenciación mioblástica. Por otra parte, Reed et al. (2014) evaluaron el efecto de diferentes niveles de nutrición entre el día 31 de gestación y el parto sobre la expresión de MRF en músculos de corderos de un día y tres meses de vida y no detectaron efectos del plano nutricional materno sobre la expresión de MYOD, miogenina o PAX 7. También en ovinos, Raja et al. (2016) evaluaron el comportamiento y la expresión de MRF de células satélite en cultivos obtenidas de músculos *semitendinosus* de corderos de un día y tres meses de vida, nacidos de ovejas sometidas a diferentes niveles nutricionales entre el día 30 de gestación y el parto. Estos autores demostraron que las células satélite obtenidas de animales restringidos al día de vida expresaron más MYOD a las 24 h de cultivo y más miogenina a las 48 h de cultivo, aunque la expresión de miogenina tras 72 h de cultivo terminó siendo menor en los animales restringidos. A su vez, en las células obtenidas de corderos de tres meses se demostró que la expresión de MYOD y miogenina fue mayor para los animales subnutridos tras 72 h de cultivo, aunque el índice de fusión mioblástica en estas células fue menor, hecho que los autores destacan como un posible efecto decisivo para un menor desarrollo muscular en los animales subnutridos (Raja et al., 2016). Por su parte, Yates et al. (2014) reportaron que el *semitendinosus* de fetos ovinos a término que padecieron retardo en el crecimiento intrauterino (RCIU) presentó menores niveles de expresión de miogenina y MYOD. Recientemente, Chang et al. (2020) indujeron RCIU a través de la exposición de ovejas a altas temperaturas entre los días 38 y 116 de su gestación y comprobaron que los músculos de los fetos de 134 días de gestación presentaron, en general, menos fibras, menores tasas mitóticas y menores niveles de expresión de los MRF MYOD, MYF6 y miogenina, aunque similares niveles de expresión de PAX 7

y MYF5. Más recientemente, Zhou et al. (2021) compararon dos planos nutricionales (100 % vs. 60 % de los requerimientos) asignados a cabras gestantes, aproximadamente entre los días 45 y 105 de gestación, y reportaron que el plano nutricional no afectó la expresión de los MRF MYF5, MYF6, MYOD ni miogenina en el músculo *vastus* fetal. De manera similar, Quigley et al. (2015) reportaron que, a pesar de que el contenido de mRNA para los MRF MYF5, MYF6, MYOD y miogenina varía en función de la edad fetal, no se ve afectado por los diferentes tamaños o patrones de crecimiento fetal.

*Efectos sobre la actividad mitótica:* por otra parte, además del interés en evaluar efectos de la subnutrición sobre la expresión de MRF, también se ha hecho hincapié en detectar diferencias en la actividad mitótica mioblástica y en la expresión de proteínas o factores vinculados a la regulación de la permanencia o abandono del ciclo celular de los mioblastos o células satélite. Una vez más, al igual que ocurre para el caso de la expresión de MRF, los trabajos difieren en aspectos muy importantes como, por ejemplo, el momento del desarrollo en el que se evalúan estas características, existiendo, en general, más trabajos evaluando la actividad mitótica en fetos de edad avanzada, fetos a término o incluso neonatos, que en fetos en edades tempranas durante la miogénesis hiperplásica fetal. Por ejemplo, Greenwood et al. (1999) realizaron un estudio en el que compararon la actividad mitótica muscular en el *peroneus longus* entre fetos grandes o pequeños a los días 100, 115 y 130 de gestación y demostraron que en los músculos de fetos de gran tamaño la cantidad de células que estaban entrando a la fase S del ciclo celular por hora fue siempre mayor y decayó menos en el tiempo en comparación con los fetos de menor tamaño. Los resultados de Greenwood et al. (1999) son, en general, consistentes con los de Yates et al. (2014), quienes reportaron que el porcentaje de células PAX 7 positivas que expresaban PCNA (un marcador de células en mitosis) era menor en el *semitendinosus* de fetos ovinos a término de 135 días que habían padecido RCIU. En un trabajo reciente, Chang et al. (2020) sometieron a ovejas gestantes a elevadas temperaturas ambientales entre los días 38 y 116 para inducir RCIU y evaluar su efecto en el desarrollo de los músculos *biceps femoris*, *tibialis anterior* y *flexor digitorum superficialis* de fetos a término de 134 días. Los autores reportaron que la

expresión de varias CDK y ciclinas que regulan la transición entre diferentes etapas del ciclo celular, incluidos los pasajes de la fase G1 a la S, de la S a la G2 y de la G2 a la mitosis, están reguladas a la baja en el *biceps femoris* de los fetos que padecieron RCIU, lo que se condice además con el hallazgo de menores actividades mitóticas evidenciadas por menores detecciones de moléculas de bromodesoxiuridina (BrdU) en todos los músculos de los fetos del grupo tratado. De todos modos, es importante resaltar que, dadas las edades fetales en las que se realizaron estas evaluaciones, lo que estos estudios, sobre todo, indican es la importancia de las células satélite y la asociación que puede tener el crecimiento retardado con una menor actividad de estas células en fetos de edades avanzadas o neonatos.

Por otra parte, unos pocos trabajos han evaluado la actividad mitótica mioblástica durante el período miogénico hiperplásico fetal. Por ejemplo, Zhu et al. (2004) evaluaron el efecto de la restricción nutricional (50 vs. 100 %) en ovejas gestantes sobre la actividad de la vía de señalización molecular mTOR (diana de la rapamicina en células de mamífero) en el *longissimus* de fetos de 78 días. La vía de señalización mTOR es considerada crítica para censar la disponibilidad de nutrientes a nivel celular y regular el crecimiento en respuesta a la disposición de nutrientes (Bolster et al., 2003). La inhibición de la vía mTOR conduce a un estancamiento de las células en la fase G1 del ciclo celular (Gaben et al., 2004) y se ha demostrado que la vía mTOR juega un rol importante en la miogénesis (Erbay et al., 2003). En ese sentido, Zhu et al. (2004) demostraron que en los músculos de fetos gestados por ovejas restringidas hay una reducción en la vía mTOR que implicaría una disminución en la expresión de otras proteínas que regulan el ciclo celular, como la ciclina D1, CDK1 y CDC25A, evitando que las células avancen en el ciclo celular y que, por lo tanto, se condice con menores actividades mitóticas mioblásticas. Recientemente, Zhou et al. (2021) compararon dos planos nutricionales (100 vs. 60 % de los requerimientos) asignados a cabras gestantes, aproximadamente entre los días 45 y 105 de gestación, y reportaron que la subnutrición reduce la actividad de la vía de señalización mTOR en músculos de fetos de unos 105 días de desarrollo. A su vez, Gauvin et al. (2020) realizaron un experimento en el que sometieron a ovejas a dietas de sobrenutrición (140 % NRC), subnutrición (60 % NRC) o control (100 %

NRC) desde el día 30 de gestación y evaluaron el desarrollo muscular fetal en tres momentos diferentes: día 45, día 90 y día 135. Los autores demostraron que en fetos de 90 días tanto la restricción como la sobrenutrición reducen la cantidad de células PAX 7 positivas, sugiriendo que la nutrición materna incide negativamente sobre el desarrollo muscular a través de una reducción en la población de células mioprogenitoras.

A su vez, también se ha puesto interés en determinar si las deficiencias en la capacidad mitótica de los mioblastos y/o células satélite de animales subnutridos son debidas a una alteración intrínseca celular o si responden a los cambios en los ambientes hormonales o de factores de crecimiento en estos animales. En ese sentido, Yates et al. (2014) demostraron que las células satélite recuperadas de fetos a término que padecieron RCIU se replicaron más lento en cultivos celulares con diferentes niveles de suplementación, lo que indicaría que estos mioblastos poseen un déficit intrínseco en su capacidad mitótica que es independiente del ambiente hormonal o de factores de crecimiento en el cual se desarrollen. No obstante, Soto et al. (2017) demostraron que a pesar de que en músculos de fetos con RCIU la cantidad de mioblastos expresando el marcador de proliferación celular Ki-67 se redujo en un 23 %, cuando estos mioblastos se cultivaron bajo estímulos hormonales adecuados respondieron y proliferaron de forma normal. Por ende, estos autores concluyeron que la maquinaria molecular necesaria para el control en la transcripción génica y la proliferación miogénica se encuentra intacta en los mioblastos de fetos con RCIU, indicando que los factores *in vivo* como los reducidos niveles de IGF-1 deberían ser los responsables de los efectos negativos observados sobre el desarrollo muscular de los fetos restringidos (Soto et al., 2017).

*Efectos epigenéticos:* finalmente, también se ha investigado para determinar con precisión la base epigenética de la programación fetal sobre el desarrollo muscular. La epigenética refiere a los cambios en la función de los genes que son heredables, pero que no implican una modificación en la secuencia del ADN (Briozzo et al., 2013). Los mecanismos epigenéticos implicados en los cambios de la expresión de los genes son básicamente tres: la metilación de la citosina, la modificación química de las histonas de la cromatina (acetilación, metilación y

fosforilación) y la acción de los micro ARN (Barker, 1998). La metilación del ADN es un mecanismo reconocido como regulador de los cambios fenotípicos que acontecen durante la miogénesis (Carrio et al., 2015). Por ejemplo, se ha demostrado que cambios en la metilación de los genes que codifican para los MRF MYF5 y MYOD se vinculan con la regulación miogénica en músculos humanos durante su desarrollo. Concretamente, se ha demostrado que un nivel aumentado de metilación en el gen MYOD y una reducción en la metilación del gen MYF5 se presentan durante la diferenciación de los miotubos primarios y el pasaje de mioblastos a miotubos (Davegårdh et al., 2017). Sin embargo, son escasos los trabajos que han explorado las bases epigenéticas que operan detrás de los efectos de programación fetal en el desarrollo muscular. Se demostró, por ejemplo, que dietas maternas bajas en aminoácidos en las etapas media y tardía de la gestación afectan la metilación del gen IGF-2R en el *longissimus* de fetos ovinos de 130 días (Lan et al., 2013). Muy recientemente, Zhou et al. (2021) reportaron que la subnutrición materna durante la gestación media afecta la metilación de sitios individuales en las regiones promotoras de MYOD y MYF5 en fetos caprinos, aunque, según los autores, los sitios de metilación afectados no parecieran estar involucrados en la regulación de la expresión de MYOD y MYF5 dado que la expresión de estas proteínas a nivel de sus mRNA no fue afectada por el tratamiento.

#### **1.5.3.5 Efectos de programación fetal sobre la composición fibrilar**

Dada la relevancia que poseen las características contráctiles y metabólicas fibrilares tanto para la producción animal como para la fisiología muscular y la salud, son varios los trabajos que han investigado los efectos de programación fetal sobre la composición fibrilar en distintas especies. De forma similar a como ocurre con la expresión de MRF y los aspectos más básicos miogénicos, se puede encontrar en la bibliografía una enorme variabilidad tanto en los momentos de la vida animal en los que se evalúan los efectos como también en las especies y en las características de los tratamientos nutricionales aplicados. La idea básica de fondo se centra en la hipótesis de que la subnutrición prenatal, además de incidir en la formación de las células musculares, también afecta los procesos de diferenciación fisiológica y

morfológica de estas. Un primer aspecto vinculado a cómo la subnutrición puede incidir sobre los tipos fibrilares maduros se debe a que las fibras fetales secundarias son las células más afectadas por la subnutrición y que se diferencian fundamentalmente a fibras de contracción rápida y metabolismo glicolítico (Picard et al., 2002, Lefaucheur y Gerrard, 2000, Lefaucheur, 2010), por lo cual cabría esperar que una subnutrición fetal redundara en músculos maduros con menores cantidades de fibras rápidas y glicolíticas. No obstante, esta idea no siempre se condice con los resultados que se han observado en diversos experimentos. Además, dada la condición plástica de los tipos de fibras, que implica que pueden variar sus propiedades a lo largo de la vida (Schiaffino y Reggiani, 2011), la interpretación y la extrapolación de una etapa a otra de los cambios en respuesta a la programación fetal es compleja. Por ejemplo, en un trabajo realizado por Wang et al. (2011) se demostró que los cambios en el nivel proteico dietario asignados a cerdas gestantes inducen cambios opuestos o contradictorios en las poblaciones fibrilares de músculos de cerdos al destete o al peso de faena. Concretamente, estos autores reportaron que una dieta alta en proteínas durante la gestación indujo al destete músculos más pesados y con mayor nivel de expresión de las isoformas de MyHC tipo II. Mientras que, por lo contrario, en animales con peso de faena los cambios fibrilares fueron los opuestos, observándose mayores proporciones de fibras tipo I y niveles reducidos de expresión de las isoformas de MyHC rápidas. Por otra parte, existen en la bibliografía diferentes posturas en relación con los cambios fibrilares que se producen tras los efectos de programación fetal, los cuales están esencialmente vinculados con la relación que existe entre los tipos de fibras y la resistencia insulínica, la capacidad para captar glucosa y la predisposición al síndrome metabólico. Algunos investigadores afirman que la subnutrición prenatal repercute en músculos con menores capacidades de captación de glucosa durante la vida adulta y que esos efectos se vinculan con mayores proporciones de fibras rápidas y glicolíticas en sus músculos. El tipo de fibra afecta a la sensibilidad insulínica principalmente a través de la expresión de GLUT4, que se encuentra en mayores cantidades en las fibras de tipo I y IIA en relación con los tipos más rápidos y glicolíticos (Daugaard y Richter, 2001, Gaster et al., 2001). Por lo tanto, los músculos con más fibras de tipo II y

metabolismo glicolítico son menos sensibles y más resistentes a la insulina (He et al., 2001, Nyholm et al., 1997). Por esta razón, algunos autores sostienen que la mayor resistencia insulínica observada en individuos que padecieron restricción nutricional prenatal está asociada a músculos con mayores proporciones de fibras rápidas y glicolíticas (Ozanne et al., 2005, Zhu et al., 2006). A su vez, otro grupo de investigaciones han propuesto que, al menos durante las etapas iniciales del desarrollo posnatal, los músculos de los animales que padecieron RCIU presentan fibras con mayores capacidades de captación de glucosa a modo de compensación por la falta de masa muscular. Es decir que, en este supuesto, los músculos de los animales subnutridos durante su desarrollo prenatal presentarían menores capacidades de captación de glucosa por causa de una reducida masa muscular, aunque (al menos inicialmente) presentarían fibras con mayores capacidades individuales de responder a la insulina. Por ejemplo, Costello et al. (2008) concluyeron que los músculos de fetos ovinos a término que padecieron RCIU expresan mayores niveles de mRNA del receptor de insulina y de GLUT4, y que estos aumentos, que implican mayores sensibilidades a la insulina y mayores capacidades de captación de glucosa, serían mecanismos compensatorios desarrollados para contrarrestar el efecto negativo que se presenta en la capacidad para captar glucosa por causa de una masa muscular reducida en los animales subnutridos. De hecho, otros investigadores han reforzado esta idea al reportar que la subnutrición prenatal es capaz de aumentar la sensibilidad insulínica y la expresión de GLUT4 en músculos de animales de laboratorio (Ozanne et al., 1996, Agote et al., 2001, De Freitas et al., 2003). Hechas estas salvedades, a continuación se resumen algunos trabajos que han evaluado efectos de programación fetal sobre la composición fibrilar en diferentes momentos del desarrollo.

En lo que respecta a fetos o animales recién nacidos, de acuerdo con Fahey et al. (2005), la subnutrición materna entre los días 30 y 70 de gestación aumenta la expresión del MyHC I y la proporción de fibras lentas en músculos de corderos de 14 días de vida. Resultados similares fueron reportados en suinos, en los que los músculos de neonatos que padecieron RCIU mostraron mayores proporciones de fibras lentas y mayor densidad capilar (Bauer et al., 2006). Estos mismos

investigadores reportaron, a su vez, que los músculos de cerdos neonatos que padecieron RCIU poseen una mayor tolerancia a la fatiga durante las contracciones isométricas, que se explica por una mayor capacidad oxidativa fibrilar (Bauer et al., 2000). En línea con esta idea, muy recientemente, Zhou et al. (2021) demostraron que la subnutrición materna aumenta las proporciones de MyHC de tipos I y IIA a la vez que reduce la expresión del MyHC IIX en el músculo *vastus* de fetos caprinos. Por lo contrario, Reed et al. (2014) reportaron que la subnutrición materna desde el día 31 hasta el parto aumenta la presencia de fibras rápidas en el *semitendinosus* de corderos de un día de vida. Algo similar fue recientemente reportado en bovinos por Costa et al. (2021), quienes sostienen que menores niveles proteicos durante la gestación media se traducen en una tendencia al aumento de la expresión de MyHC tipo IIX en los músculos de terneros de 30 días de vida.

Por otra parte, en lo que respecta a efectos de programación fetal sobre tipos fibrilares medidos en edades más avanzadas, varios autores trabajando en diferentes especies han asociado una subnutrición gestacional con un aumento de las fibras lentas y oxidativas en los músculos de la progenie. De acuerdo con Tygesen et al. (2007), los corderos de cinco meses de edad nacidos de ovejas subnutridas durante el final de su gestación presentan mayor área ocupada por fibras de tipo I en el músculo *longissimus*. Resultados similares fueron reportados más recientemente por Piaggio et al. (2018), quienes demostraron que el porcentaje de fibras oxidativas es mayor en músculos de corderos de seis meses de edad nacidos de ovejas subnutridas durante la gestación media. Consistentemente con estos resultados, Mohrhauser et al. (2015) reportaron que la expresión de MyHC IIA fue mayor en el *semitendinosus* de novillos nacidos de vacas sometidas a restricción nutricional durante la gestación media. A su vez, muy recientemente se demostró en cabras que una subnutrición materna aumenta la expresión de MyHC I y IIA y reduce la de MyHC IIX en el *semitendinosus* de animales de 91 días de vida (Zhou et al., 2021). En conejos, Dalle Zotte et al. (2005) reportaron que una nutrición maternal reducida reduce la proporción de fibras rápidas y glicolíticas en los músculos de las crías al destete. Resultados similares también se han reportado en roedores de laboratorio, en los que una dieta reducida en su tenor proteico durante la gestación media aumenta la

presencia de fibras de tipo IIA en el *soleus* de ratas de 25 y 90 días de vida (Toscano et al., 2008). No obstante, algunos otros trabajos también realizados en diferentes especies han propuesto efectos opuestos a los anteriores o bien ausencia de efectos. Según Zhu et al. (2006), la restricción nutricional materna (gestación temprana y media) aumenta la expresión de la isoforma IIB de MyHC en el *longissimus* de corderos de ocho meses de vida. Resultados similares fueron obtenidos por Daniel et al. (2007), quienes reportaron, en general, que una menor nutrición materna aumentó el número de fibras rápidas en el *longissimus* de corderos de más de 4 meses de edad. Por su parte, Reed et al. (2014) no detectaron diferencias en los tipos de fibras en el músculo *semitendinosus* de corderos de tres meses de vida hijos de ovejas sometidas a diferentes niveles de nutrición entre el día 31 de gestación y el parto. Algo similar fue también reportado por Sen et al. (2015), quienes informaron que la subnutrición (50 % de los requerimientos diarios) entre el día 30 y 80 de gestación en ovejas no afectó la distribución de los tipos de fibras en el *longissimus* y *semitendinosus* de corderos de 150 días de vida. Más aun, según Krausgrill et al. (1999) una restricción alimentaria diseñada para perder entre 25 y 35 % de peso corporal durante los primeros 70 días de gestación en ovejas no afecta la distribución de los tipos fibrilares en el *semitendinosus* de la progenie cuando se faenan con 35 kg de peso corporal. A su vez, Costa et al. (2021) recientemente investigaron los efectos de diferentes niveles proteicos durante la gestación media (entre los días 100 y 200 de gestación en vacas) sobre las características musculares de la progenie y demostraron que el músculo *longissimus* no mostró cambios fibrilares a los 450 días de vida posnatal. Resultados similares han sido recientemente comunicados por Gardner et al. (2021), quienes evaluaron el impacto de una dieta de mantenimiento vs. una dieta diseñada para perder un punto de condición corporal durante la gestación media (período de 84 días) en vacas sobre las características musculares de la progenie y reportaron que las diferentes dietas no afectan la expresión de los MyHC en músculos de terneros tanto al inicio como al final de la fase de engorde intensivo.

#### **1.5.3.6 ¿Qué mecanismos pueden explicar los cambios fibrilares tras el RCIU?**

Como se comentó recién, múltiples estudios en diversas especies se han concentrado en detectar la existencia de cambios fibrilares inducidos por programación fetal. A pesar de que muchos trabajos muestran resultados contradictorios, se puede decir, en general, que se ha demostrado que la nutrición prenatal induce cambios fibrilares que pueden evidenciarse en diferentes momentos del desarrollo posnatal. No obstante, los mecanismos que están detrás de estos cambios no han sido tan profundamente evaluados. Como se comentó antes, una primera línea desarrollada para explicar los cambios fibrilares que induce la restricción nutricional prenatal está asociada con la diferenciación de las fibras fetales a los tipos fibrilares maduros y el impacto que tiene la subnutrición, principalmente, sobre las fibras fetales secundarias. No obstante, algunos trabajos han profundizado en las causas que explican los cambios fibrilares tras el RCIU, destacando, por ejemplo, el rol que pueden tener algunos cambios hormonales o, incluso, cambios en la expresión de algunos MRF. Se ha demostrado, por ejemplo, que las diferencias en los niveles de expresión de distintos MRF (MYOD y miogenina) podrían estar involucradas en la diferenciación de los precursores fibrilares a fibras con diferentes velocidades de contracción (Hughes et al., 1993). Concretamente, algunos investigadores sugieren que los bajos niveles de expresión de la proteína MYOD podrían inducir una reducción en el desarrollo de las fibras de contracción rápida (Lefaucheur y Gerrard, 2000). Por otra parte, algunos investigadores han hecho hincapié en el rol de las hormonas tiroideas como mediadoras de los cambios fibrilares que acontecen tras el RCIU. Esta idea ha sido ampliamente revisada por Bauer et al. (2003). De acuerdo con estos autores, existe evidencia de que el RCIU provoca una transición fibrilar desde fibras tipo II a fibras tipo I que se acompaña, además, de cambios en la contractibilidad y de aumentos en la resistencia a la fatiga (Bauer et al., 2000, Wank et al., 2000). A su vez, estos autores desarrollan esta idea basándose en que en neonatos de desarrollo normal el tipo fibrilar predominante es el IIB y el aumento en las fibras de tipo I se va dando a medida que la edad del animal avanza (Finkelstein et al., 1992). Además, dado que estos cambios fibrilares, así como el aumento en la trama vascular, se han vinculado

con el efecto de las hormonas tiroideas (Hausman, 1989, Hausman y Watson, 1994), se propone que los cambios fibrilares que se evidencian en neonatos con RCIU se deberían a elevados niveles de hormonas tiroideas (Bauer et al., 2003). Asimismo se ha demostrado que los efectos de las hormonas tiroideas sobre la plasticidad fibrilar podrían depender no solo de la cantidad de hormona circulante, sino también de diferencias en los niveles de expresión de los diferentes tipos de receptores específicos. Las hormonas tiroideas ejercen sus efectos tras interactuar con receptores proteicos específicos de ubicación nuclear. Estos receptores se unen a secuencias específicas del ADN denominadas elementos de respuesta tiroidea para regular la transcripción de genes específicos. Sin embargo, en ausencia de hormonas tiroideas, sus receptores son igualmente capaces de unirse a los elementos de respuesta tiroidea del ADN nuclear para reprimir la transcripción basal de genes específicos. Esto sugiere que los propios receptores tiroideos poseen una capacidad dual (tanto T3-dependiente como T3-independiente) de regular la transcripción de genes (Göthe et al., 1999). Basándose en modelos de ratones *knock out*, Yu et al. (2000) demostraron que las distintas isoformas del receptor de hormonas tiroideas ejercen un efecto diferencial sobre la plasticidad fibrilar en función del tipo de músculo involucrado. En un músculo rápido y glicolítico como el *extensor digitorum longus*, la ausencia de expresión de las isoformas TR- $\alpha$ 1, TR- $\beta$ , o de ambas, produjo una disminución en la expresión de la isoforma de MyHC IIB y un aumento en la cantidad de fibras lentas. Por otra parte, en un músculo lento como *soleus*, el aumento en la cantidad de fibras lentas se produjo exclusivamente cuando se bloqueó la expresión de la isoforma TR- $\alpha$ 1, mientras que aquellos ratones que no expresaron la isoforma TR- $\beta$  no sufrieron modificaciones en la distribución de los tipos contráctiles fibrilares del *soleus* (Yu et al., 2000). Finalmente, según Bauer et al. (2003), los cambios fibrilares evidenciables tras el RCIU dependerían de las hormonas tiroideas y estarían, además, vinculados con diferencias en el nivel de madurez fisiológica alcanzado por los músculos de animales normales o con RCIU. Según estos mismos autores, los músculos de neonatos con RCIU presentan fibras de tipo I más maduras (Wank et al., 2000), lo que indica que el RCIU acelera la maduración fibrilar. Además, esto se condice con niveles aumentados de tiroxina

observados en los neonatos con RCIU (Bauer et al., 2003). Dado que la tiroxina acelera la madurez fibrilar (Hausman y Watson, 1994), estos autores concluyen que los músculos de animales con RCIU presentan cambios fibrilares que se deben a una madurez acelerada por causa de mayores niveles de hormonas tiroideas (Bauer et al., 2003).

#### **1.5.3.7 Efectos sobre la calidad de la carne**

Los motivos por los cuales se ha puesto interés en evaluar posibles efectos de programación fetal sobre la calidad de carne son variados. Los diferentes atributos de calidad de carne representan variables complejas que están determinadas por la interacción de diferentes factores musculares intrínsecos y extrínsecos que inciden en los procesos de transformación de músculo a carne. Los factores intrínsecos del músculo tienen que ver con aspectos estructurales y metabólicos de todos los tejidos que lo componen. Como vimos recién, el ambiente intrauterino prenatal puede afectar las características musculares alterando la presencia de diferentes tipos de fibras, así como también variando el tamaño y la cantidad de las fibras presentes en un músculo. A su vez, la programación fetal también puede repercutir en la calidad de la carne induciendo efectos sobre el desarrollo de los tejidos no musculares que componen los músculos. Básicamente, la programación fetal es capaz de incidir en el desarrollo de los tejidos conjuntivos intramusculares (adiposo y tejido intramuscular de sostén) que influyen notoriamente sobre la calidad de carne. El tejido adiposo intramuscular es determinante sobre dos de las propiedades sensoriales más importantes de la carne: terneza y jugosidad (Wood et al., 2008). Del mismo modo, la naturaleza, distribución espacial y abundancia relativa del tejido conjuntivo de sostén dentro del músculo son factores altamente influyentes sobre diferentes atributos cualitativos de la carne (Purslow, 2005). Tanto el tejido adiposo como el conjuntivo de sostén, al igual que el tejido muscular, se desarrollan durante la vida intrauterina, con el agregado de que los tres tipos de tejido comparten los mismos progenitores mesenquimales (Du et al., 2010). Más aun, estos procesos miogénicos, adipogénicos y fibrogénicos también se solapan en el tiempo durante el desarrollo (Du et al., 2010), lo que determina que ante restricciones nutricionales pueda ocurrir

que algún proceso se favorezca por sobre otro determinando cambios proporcionales entre los diferentes tipos de tejidos que forman los músculos y que esto termine incidiendo en la calidad final del producto. Por estas razones, diversos trabajos han presentado resultados evaluando efectos de programación fetal sobre calidad de carne en distintas especies productivas. De forma aún más notoria que lo que ocurre con las variables de desarrollo muscular, la interpretación de estos resultados es compleja, dado que además de que los trabajos difieren en múltiples aspectos metodológicos, la complejidad que caracteriza a las variables de calidad de carne hace muy difícil la obtención de conclusiones definitivas. Como se verá en profundidad más adelante, los diferentes músculos de la canal pueden ser afectados de forma diferente por la programación fetal y, al mismo tiempo, se transforman en carne también de forma diferente, lo que hace, por ejemplo, muy difícil comparar resultados obtenidos en distintos músculos. De todos modos, a continuación se resumen los resultados obtenidos por varios autores en diversas especies en relación con efectos de programación fetal sobre la calidad de la carne.

En la especie ovina, la mayoría de los trabajos que evalúan efectos de programación fetal sobre calidad de carne reportan escasos o nulos efectos. Sen et al. (2016) evaluaron el efecto de tres niveles de nutrición (175, 100 y 50 % de los requerimientos diarios) asignados a ovejas gestantes entre los días 30 y 80 de gestación y reportaron que la subnutrición materna no afecta la terneza (fuerza de corte) ni las pérdidas por cocción en los músculos *longissimus dorsi* y *semitendinosus* de corderos machos y hembras de 150 días de vida. Resultados similares fueron comunicados por Tygesen et al. (2007), quienes reportaron que una restricción nutricional materna del 60 % de los requisitos de mantenimiento durante las últimas seis semanas de gestación no afecta la fuerza de corte en los músculos *longissimus dorsi* y *biceps femoris* de corderos machos de 145 días de vida. Al mismo tiempo, estos autores tampoco detectaron efectos de la subnutrición materna sobre otras variables asociadas con la terneza de la carne, como el índice de fragmentación miofibrilar, la cantidad de desmina no degradada o las actividades calpaínicas y calpastatínicas (Tygesen et al., 2007). Más recientemente, y a nivel nacional, Luzardo et al. (2019) reportaron que una restricción energética del 60 % de

los requerimientos en ovejas entre los días 48 y 106 de gestación tampoco generó efectos sobre la fuerza de corte en el músculo *longissimus lumborum* de corderos machos de 190 días, en promedio. Resultados muy similares fueron también comunicados por Piaggio et al. (2018), quienes demostraron que una restricción energética del 70 % entre los días 45 y 115 de gestación no afecta la fuerza de corte en el músculo *longissimus lumborum* de corderos machos y hembras de 32 kg de peso corporal. Sin embargo, en un experimento en el que, a diferencia de los anteriores, el enfoque estuvo en inducir una subnutrición gestacional temprana, se reportó que una restricción alimentaria diseñada para perder entre 25 y 35 % de peso corporal durante los primeros 70 días de gestación produce carne más tierna en el músculo *semimembranosus* de corderos de 35 kg de peso corporal (Krausgrill et al., 1999).

En lo que respecta a la especie bovina, la mayoría de los trabajos publicados se han centrado en evaluar los efectos de la subnutrición durante las etapas media y final de la gestación, reportando, en general, también resultados variados e inconsistentes. Underwood et al. (2010) estudiaron el efecto de consumir por 60 días campo natural vs. pasturas mejoradas en vacas con gestaciones de 120 a 150 días sobre la terneza de la carne del músculo *longissimus* de novillos de 460 días de edad y demostraron que la carne de los animales nacidos de madres alimentadas con pasturas mejoradas resultaba más tierna que la de los animales nacidos de madres que pastorearon campo natural. Por su parte, Maresca et al. (2019) recientemente también reportaron efectos positivos de una mejor alimentación materna sobre la terneza de la carne de la progenie. Estos autores demostraron que la carne (músculo *longissimus*) de novillos Aberdeen Angus de 25 meses de edad, hijos de vacas alimentadas con una dieta alta en proteína durante la gestación tardía, presentó menor fuerza de corte y tendió a presentar mayor longitud del sarcómero (Maresca et al., 2019), al tiempo que no se encontró efecto del tratamiento sobre el colágeno total, el colágeno insoluble y la relación colágeno insoluble-colágeno total. Asimismo, Webb et al. (2019) también evaluaron la influencia de la restricción de proteína metabolizable durante la gestación media y/o tardía de vaquillonas cruzas sobre las características de calidad de la carne de la progenie, concluyendo que la reducción de

la proteína metabolizable materna en la mitad de la gestación disminuye la terneza de la carne de los novillos medida como fuerza de corte en el músculo *longissimus lumborum*, mientras que la restricción exclusivamente aplicada durante la gestación tardía no produce efectos. Al mismo tiempo, estos autores reportaron que el aporte proteico en la dieta materna no produjo efectos sobre las pérdidas por cocción en ninguna de las dos etapas evaluadas (Webb et al., 2019). Por otra parte, Alvarenga et al. (2016) también se centraron en el aporte proteico de la dieta materna, pero en este caso estudiaron las diferencias entre dietas aplicadas en etapas muy tempranas de la gestación. En general, estos autores concluyeron que el bajo nivel de proteína durante la gestación temprana (14 vs. 7 % desde 60 días antes del servicio hasta 24 días después de la concepción) produce carne menos tierna en el músculo *semitendinosus*, sin observarse efectos sobre el músculo *longissimus* de novillos de 20 meses de edad. Asimismo, en este mismo trabajo el nivel proteico de la dieta materna no afectó la capacidad de retención de agua ni la longitud de los sarcómeros para los músculos *longissimus* y *semitendinosus*. Por otra parte, muy recientemente, Ramírez et al. (2020) se centraron en el aporte energético de la dieta y compararon tres niveles de nutrición energética durante la gestación tardía (50, 75 % de los requerimientos y grupo control sin restricción) sobre la calidad de la carne de bovinos de 27 meses de edad, reportando que la carne del *longissimus* de los novillos hijos de vacas que padecieron restricción severa, así como hijos de vacas sin restricción, resulta más tierna en comparación a la de los hijos de vacas con moderada restricción, sin reportarse efectos sobre la longitud del sarcómero, la cantidad de colágeno total e insoluble, ni tampoco el índice de fragmentación miofibrilar. A su vez, Mohrhauser et al. (2015) también se centraron en evaluar el componente energético dietario y trabajaron con una restricción nutricional energética durante la gestación media de bovinos, reportando que un peor balance energético de vacas gestantes entre los días 84 y 175 de gestación mejora la terneza y reduce el contenido de colágeno de la carne del músculo *longissimus dorsi* de novillos de 208 días. Algo similar ha sido recientemente reportado por Gardner et al. (2021), quienes evaluaron el impacto de una dieta de mantenimiento vs. una dieta diseñada para perder un punto de condición corporal durante la gestación media

(período de 84 días) en vacas y demostraron que la carne de los animales hijos de vacas peor alimentadas presentó mejor nivel de terneza medida sensorialmente.

Al parecer, a la luz de los resultados antes resumidos, los efectos de la subnutrición materna sobre la programación fetal de la calidad de la carne y, en particular, de la terneza, podrían depender tanto del momento en el que se induce la restricción, como de la intensidad del tratamiento, pero también del tipo de restricción aplicada: global, energética o proteica. Estas diferencias han sido revisadas por Oskberg et al. (2013), quienes precisaron los efectos inducidos por programación fetal sobre la calidad de carne en suinos, dividiéndolos en restricciones globales o proteicas. En lo que respecta a restricciones globales, los antecedentes incluyen trabajos contradictorios en cuanto al hallazgo o no de efectos. Por ejemplo, Nissen et al. (2003) evaluaron el impacto de tres dietas diferentes durante la gestación temprana a media asignada a cerdas gestantes y reportaron que no existió ningún efecto sobre diversas variables de calidad (pH, color o capacidad de retención de agua) en la carne de la progenie. Sin embargo, de acuerdo con Cerisuelo et al. (2009), la carne de cerdos cuyas madres recibieron un nivel más elevado de nutrición durante la gestación media presentó un pH final más elevado que se acompañó de una menor luminosidad. De forma similar, McNamara et al. (2011) reportaron que el pH a los 45 minutos fue mayor, la luminosidad, menor y las pérdidas por goteo, mayores en el *semimembranosus* de cerdos cuyas madres fueron mejor alimentadas durante la gestación temprana. En lo que respecta a las restricciones proteicas, Wang et al. (2011) reportaron que dos dietas contrastantes en su nivel de aporte proteico a lo largo de toda la gestación no inducen diferencias en la calidad de la carne de la progenie (pH, fuerza de corte, pérdidas por goteo o color). No obstante, Rehfeldt et al. (2012) demostraron que la carne de cerdos nacidos de madres que recibieron una dieta reducida en proteínas durante toda la gestación resultó más tierna (presentó menor fuerza de corte) que la de los animales controles. Algo similar fue también reportado por Oskberg et al. (2013), quienes demostraron que la carne de cerdos machos nacidos de madres que recibieron una dieta reducida en proteínas mostró menor fuerza de corte y, por lo tanto, mejor terneza instrumental.

#### **1.5.3.8 Diferentes músculos de la canal pueden presentar susceptibilidades distintas a los efectos de programación fetal**

Un aspecto muy interesante, pero que, a la vez, complejiza muchísimo la interpretación de las conclusiones obtenidas por diferentes trabajos en relación con la programación fetal y el desarrollo muscular, es que no todos los músculos de la canal de un animal padecen de igual forma los efectos negativos de la programación fetal. Esto implica que, así como existe un orden de priorización que se manifiesta en diferentes efectos de programación fetal entre diferentes órganos o sistemas de los animales, también existiría algo similar cuando se compara la intensidad de los efectos de programación fetal entre diferentes músculos de la canal. Este hecho, desde la perspectiva de la producción animal, no es menor dado que los diferentes músculos de la canal representan diferentes cortes o piezas de carne que implican diferencias muy apreciables tanto en sus atributos cualitativos como en su valoración comercial. Los primeros reportes que indican la existencia de efectos músculo-dependientes de programación fetal fueron realizados a principios de la década de los noventa utilizando suinos. Ward y Stickland (1991) condujeron un experimento en el que sometieron a cerdas gestantes a una restricción del 60 % de los nutrientes totales y evaluaron el desarrollo muscular fetal en dos músculos contrastantes en sus características fibrilares maduras: el *triceps brachii* como músculo rápido y glicolítico y el *soleus* como músculo lento y oxidativo. Con este modelo los autores reportaron que al nacer la subnutrición materna había sido capaz de reducir en un 26 % el número total de fibras en el músculo rápido, mientras que en el músculo lento no se evidenciaron efectos. Asimismo, los autores demostraron que durante el desarrollo hubo un momento en el cual se constataban diferencias en la cantidad de fibras en el músculo *soleus*, pero que, sin embargo, desaparecieron al momento del nacimiento por causa de una extensión de la fase hiperplásica miogénica. Los autores concluyeron, además, que las diferencias entre los efectos sufridos por ambos tipos de músculos estarían asociadas a la cantidad de fibras fetales secundarias y miotubos primarios que presenta cada uno durante su desarrollo, ya que las fibras fetales secundarias serían las más afectadas por la subnutrición materna. Un año más tarde, miembros del mismo equipo de investigadores (Dwyer y Stickland, 1992) diseñaron

otro experimento, pero con la finalidad de determinar si las diferencias en la susceptibilidad a la subnutrición prenatal podían deberse no solo a diferencias en las características fibrilares musculares, sino también a la posición anatómica de los músculos. Para ello, sometieron a cerdas gestantes a una restricción del 40 % y evaluaron el desarrollo muscular de la progenie, incluyendo esta vez tres músculos: el *biceps* como músculo rápido y de ubicación craneal y proximal, el *soleus* como músculo lento y de ubicación caudal y distal y el *extensor digitorum longus* como músculo también rápido, pero de ubicación caudal y distal. Con este diseño, los autores reportaron que el tratamiento indujo efectos significativos y similares sobre el desarrollo de los músculos *biceps* y *extensor digitorum longus*, pero que no afectó al *soleus*, por lo que concluyeron que los efectos de la programación fetal no dependerían de la posición anatómica, sino de la composición fibrilar que caracteriza a cada músculo. A partir de estos trabajos, se han publicado diversos estudios que soportan esta idea. Estos abarcan investigaciones desarrollados en diferentes especies, evaluando efectos sobre variables diferentes y también en distintos momentos del desarrollo. Por ejemplo, en un trabajo reciente se demostró que tanto la subnutrición como la sobrenutrición maternal en ovejas gestantes altera la población de células miogénicas positivas a PAX 7 de un modo músculo-dependiente durante el desarrollo fetal (Gauvin et al., 2020). Estos autores evaluaron el desarrollo en tres músculos diferentes y en distintos momentos de la vida fetal y encontraron diferencias significativas en los efectos de la nutrición materna sobre la expresión de distintos genes dependiendo del músculo involucrado, concluyendo que es fundamental considerar al músculo como un elemento clave a la hora de evaluar los efectos de programación fetal sobre su desarrollo. Por otra parte, Fahey et al. (2005) reportaron efectos músculo-dependientes de programación fetal sobre los tipos fibrilares en corderos de pocos días de vida. Concretamente, estos autores demostraron que en corderos de 14 días la subnutrición gestacional produce cambios fibrilares en los músculos *longissimus dorsi* y *vastus lateralis*, aunque no en el músculo *semitendinosus* (Fahey et al., 2005). Estos efectos dependientes del músculo han sido demostrados también en animales de mayor edad. Por ejemplo, Daniel et al. (2007) reportaron que en corderos de 24 semanas la subnutrición gestacional

aumentó el contenido de grasa en los músculos *longissimus dorsi* y *semitendinosus*, redujo el diámetro de las fibras lentas en el *longissimus dorsi*, aumentó la proporción de fibras rápidas y redujo el diámetro de las fibras oxidativas en el *semitendinosus* y redujo el diámetro fibrilar en general en el *vastus lateralis* (Daniel et al., 2007). Asimismo, en este mismo trabajo se reportó que una restricción nutricional hasta el día 85 de preñez aumentó el contenido adiposo y disminuyó el diámetro fibrilar en el *longissimus dorsi* y aumentó la presencia de fibras rápidas en el *semitendinosus*, mientras que no alteró la composición fibrilar del *vastus lateralis* (Daniel et al., 2007). De forma similar, Sen et al. (2015) también reportaron efectos diferentes de programación fetal sobre algunas variables fibrilares entre distintos músculos. Estos autores encontraron, por ejemplo, que la subnutrición aumentó el contenido de grasa en el *longissimus*, pero no en el *semitendinosus*, así como también que la subnutrición fue capaz de aumentar el diámetro de las fibras IIA en el *longissimus*, pero no en el *semitendinosus* de corderos de 150 días de vida. Más aún, también existen trabajos en rumiantes que sugieren que los efectos músculo-dependientes no solo se pueden evidenciar sobre variables de composición muscular, sino también sobre la calidad de la carne. En ovinos, Krausgrill et al. (1999) reportaron que una restricción alimentaria desde la concepción hasta el día 70 de gestación provoca carne más tierna en el músculo *semimembranosus*, pero no en el *semitendinosus* de las crías, en tanto que, en bovinos, Alvarenga et al. (2016) reportaron que una restricción proteica gestacional produce carne menos tierna en el músculo *semitendinosus* de la progenie, mientras que en el *longissimus* no se observaron efectos.

Como se comentó antes, una primera teoría vinculada a explicar las diferencias en la susceptibilidad entre músculos a la programación fetal está relacionada con las diferencias en la cantidad de fibras fetales secundarias que forman distintos músculos. Este aspecto ha sido resaltado por Picard et al. (2002) en su revisión, donde concluyen que los miotubos primarios, por estar más relacionados a fijar la citoarquitectura muscular básica, son menos sensibles a los efectos ambientales y epigenéticos, y que dado que los músculos lentos y oxidativos suelen contener más miotubos primarios durante su desarrollo fetal, tenderían a padecer

menos los efectos de la programación fetal por subnutrición. No obstante, existen otros autores que destacan la importancia que también pueden tener en las distintas respuestas a la programación fetal las diferencias que existan entre músculos en los momentos en los que cada uno experimenta las etapas miogénicas. Esto lo destacan, por ejemplo, Rehfeldt et al. (2011) en su revisión, en la que aluden a las distintas ventanas temporales en el desarrollo muscular, en las que los efectos pueden ser más o menos relevantes, y lo vinculan con el hecho de que no todos los músculos de la canal de un animal se desarrollan exactamente al mismo tiempo. A su vez, otro de los factores que también puede explicar las diferentes respuestas a la programación fetal entre músculos distintos puede vincularse con diferencias en el origen embrionario de cada músculo. Estos aspectos han sido revisados por Comai y Tajbakhsh (2014). Estas diferencias son muy evidentes cuando se compara, por ejemplo, a los músculos del tronco y las extremidades que se originan del mesodermo paraxial o somítico con los músculos de la cabeza que se originan del mesodermo craneal no segmentado. A su vez, como se comentó antes, dentro del mesodermo somítico también pueden establecerse diferencias en el origen de distintos músculos (Soussi-Yanicostas, 1991). Más aun, de acuerdo con Comai y Tajbakhsh (2014), las diferencias en los patrones de desarrollo entre distintos músculos pueden ser mucho más complejas e involucrar aspectos moleculares como diferencias en el orden de expresión de diferentes MRF. Por ejemplo, estos autores destacan que la emergencia de precursores miogénicos PAX 7 positivos durante la embriogénesis es notoriamente distinta entre músculos de las regiones del tronco, los miembros o la cabeza. Por otra parte, también subrayan que las señales que regulan la cascada en la expresión de MRF en las células miogénicas varían dependiendo de la región muscular. Por ejemplo, en los músculos del tronco, antes de la expresión de los sucesivos MRF se puede evidenciar la expresión del factor PAX 3 en las células mioprogenitoras en división. No obstante, esto no ocurre en los músculos de la cabeza (Comai y Tajbakhsh, 2014). Más aun, las diferencias en los patrones moleculares para el desarrollo y las capacidades proliferativas también son evidentes cuando se comparan las células satélite en músculos con distintos orígenes embrionarios (Ono et al., 2010). Asimismo, también se ha reportado que músculos con diferentes

orígenes embriológicos muestran diferencias en las capacidades para responder a señales parácrinas durante su desarrollo. Por ejemplo, los músculos del tronco o de la cabeza responden de forma opuesta a la señalización por parte de las WNT (Tzahor et al., 2003).

En síntesis, podemos decir que, ya sea por los orígenes embriológicos, las diferencias temporales en el desarrollo o las características fibrilares de los músculos, existe suficiente evidencia que indica que los efectos ambientales nocivos durante el desarrollo prenatal afectan de forma diferente a distintos músculos de la canal de un animal.

#### **1.5.3.9 Efectos de programación fetal sobre el desempeño productivo de animales carniceros**

Uno de los aspectos claves del concepto de programación fetal, cuando se lo analiza desde la perspectiva de la producción animal, radica en comprender que implica el establecimiento de un límite generado por las perturbaciones durante el desarrollo temprano para el desempeño de un animal en su futura vida. De ese modo podemos visualizar la programación fetal como un fenómeno capaz de colocar un techo a la potencialidad productiva de los animales. De acuerdo con Bell et al. (2006), la enorme variabilidad en términos de eficiencia productiva que se puede observar entre diferentes establecimientos, poblaciones o rebaños de animales que son manejados de forma similar y que no presentan diferencias importantes en sus características genéticas, puede ser explicada por efectos ambientales acumulados dentro de estas poblaciones que provienen de perturbaciones ambientales generadas durante el desarrollo embrionario y fetal. Se supone que la mayoría de los efectos de programación fetal responsables de limitar la capacidad de crecimiento posnatal y la eficiencia en los sistemas de producción de carne están vinculados a los efectos negativos sobre el desarrollo muscular que implican menores posibilidades de síntesis proteica, más acumulación de grasa y, por ende, una eficiencia alimentaria menor. No obstante, la programación fetal también puede incidir en la productividad a través de otra serie de aspectos que trascienden el desarrollo muscular y adiposo temprano. Por ejemplo, la programación fetal incide en la productividad a través del

desarrollo de los órganos digestivos, que no solo definen la capacidad de asimilar nutrientes sino que también inciden en otros aspectos como la inmunocompetencia. De acuerdo con Meyer et al. (2010), la subnutrición materna es capaz de afectar los cambios que ocurren en el desarrollo intestinal prenatal, lo que puede, en parte, explicar las diferencias observadas en el desarrollo posnatal de los animales. Otro de los aspectos fundamentales a través de los cuales la programación fetal puede incidir en la eficiencia productiva de los animales son las modificaciones en la función metabólica. En ese sentido, varios trabajos realizados en diferentes especies han reportado efectos de programación fetal sobre la capacidad para producir y/o utilizar glucosa, así como cambios asociados a la secreción de insulina. Se ha demostrado, por ejemplo, que la nutrición prenatal puede incidir en la estructura y la función de los islotes pancreáticos en roedores (Fowden y Hill, 2001), así como también repercutir en aumentos en la glicemia y alteraciones en la secreción insulínica en ovinos (Ford et al., 2007). También en ovinos, se ha demostrado que una severa restricción en el crecimiento uterino provocada por la exposición a altas temperaturas de ovejas preñadas reduce tanto el peso del páncreas fetal como el área pancreática ocupada por las células  $\beta$  (Limesand et al., 2005). Un tercer aspecto que también puede ser afectado por la programación fetal y al cual se lo ha asociado con el desempeño productivo de los animales es su respuesta inmune. De acuerdo con lo revisado por Cronjé (2003), existe suficiente evidencia de que la nutrición prenatal es capaz de afectar la expresión génica vinculada al sistema inmune y al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal fetal, así como también puede reducir la proliferación linfocitaria en el bazo y el timo fetal, pudiendo estos efectos perdurar en la vida adulta limitando la respuesta inmune de los animales durante su etapa productiva. Por estas razones, diversos trabajos han explorado los efectos de la programación fetal por subnutrición sobre variables de desempeño productivo en animales carnívoros. A nivel nacional y en ovinos, Piaggio et al. (2018) no detectaron diferencias en las tasas de ganancia ni en la eficiencia de conversión, aunque sí un aumento en el consumo de corderos cuyas madres fueron alimentadas con 70 % de sus requerimientos desde el día 45 al 115 de gestación. Por otra parte, Sibbald y Davidson (1998) evaluaron los efectos de la subnutrición en ovejas durante la gestación tardía y la lactancia sobre el consumo

de sus corderos, sin observar efectos del tratamiento. De forma similar, Krausgrill et al. (1999) reportaron que la restricción nutricional durante la gestación temprana no ejerció efectos en el peso al nacimiento ni en la tasa de crecimiento posnatal, ni incidió tampoco en la edad de los animales al momento de alcanzar el peso previsto de faena (35 kg). Por su parte, Luzardo et al. (2019) evaluaron la restricción energética maternal entre los días 48 y 106 de gestación en ovejas y reportaron que no incide en el peso al nacer, al destete o a la faena, a la vez que tampoco afecta el consumo, la eficiencia ni los pesos de las carcasas ni el rendimiento carnicero de los corderos. Sin embargo, contrariamente, Nordby et al. (1987) reportaron que corderos nacidos de madres restringidas al 70 % desde 30 días antes de la concepción hasta los 100 días de gestación presentaron menores tasas de ganancia durante el engorde. De forma similar, Daniel et al. (2007) observaron que los corderos hijos de madres restringidas al 50 % de sus requerimientos entre los días 30 y 70 de gestación crecieron más lento durante el engorde (tuvieron menores ganancias de peso diarias) y fueron más livianos al faenarlos con 24 semanas de edad. Resultados similares fueron reportados por Sen et al. (2015), quienes demostraron que la nutrición materna afectó el peso final de faena alcanzado por los corderos a los 150 días de vida. Los corderos que padecieron restricción intrauterina llegaron a la faena siendo más livianos, tuvieron menores ganancias de peso diarias y resultaron en carcasas más livianas a la faena (Sen et al., 2015). Recientemente, Sartori et al. (2020) realizaron un metaanálisis con el fin de resumir los efectos generados por la subnutrición y la sobrenutrición gestacional en ovejas sobre el peso y las dimensiones corporales de la progenie en diferentes momentos de su desarrollo. Estos autores concluyeron que la subnutrición durante los dos últimos tercios de la gestación reduce el peso fetal, el peso al nacer y el peso durante la vida posnatal, a la vez que no alteraría las dimensiones corporales de los animales. Resultados contradictorios también han sido recientemente comunicados en bovinos. Ramírez et al. (2020) determinaron el efecto del estatus energético materno durante la gestación tardía sobre el crecimiento y la calidad de la carcasa de la progenie y reportaron que los terneros nacidos de vacas restringidas fueron más livianos, aunque al destete y a la faena no hubo diferencias. Además, estos autores reportaron que los novillos hijos

de vacas restringidas demostraron una capacidad compensatoria de crecer manifiesta a través de una tendencia a mayores ganancias de peso diarias. Más recientemente, Gardner et al. (2021) evaluaron el impacto de una dieta diseñada para perder un punto de condición corporal durante la gestación media (período de 84 días) en vacas y demostraron que esta no afectó el peso al nacer, el peso al destete, la ganancia diaria, la eficiencia de conversión, el consumo ni el rendimiento de la carcasa. Por su parte, Noya et al. (2022) muy recientemente reportaron que una subnutrición al 65 % de los requerimientos durante el primer tercio de la gestación bovina es capaz de reducir el peso de la progenie tanto al destete como a la faena, afectando la capacidad de crecimiento posnatal y produciendo, además, canales más livianas y engrasadas.

#### **1.5.4 Efectos sexo-dependientes de programación fetal**

Como se comentó anteriormente, el concepto de programación fetal fue originalmente desarrollado para explicar la mayor incidencia de algunas enfermedades crónicas en humanos asociándolas epidemiológicamente con retardo en el crecimiento intrauterino (RCIU) o reducido peso al nacer. A partir de esta idea, se demostró que la subnutrición y otros estresores ambientales durante la vida temprana predisponen a padecer diversos trastornos en individuos adultos. A su vez, algunos investigadores comenzaron a cuestionarse si la mayor o menor incidencia que poseen algunos trastornos crónicos entre individuos de diferentes sexos podía estar de algún modo vinculada a los efectos de programación fetal. De ese modo, se comenzó a estudiar si los efectos de programación fetal sobre la incidencia de enfermedades podían variar (ser más o menos intensos) dependiendo del sexo del individuo. Los primeros trabajos que relacionaron el sexo del individuo con efectos de programación fetal estuvieron vinculados con la respuesta al estrés. Weinberg (1988) se interesó en los posibles efectos sexo-dependientes del consumo prenatal de alcohol sobre la respuesta al estrés de la progenie y demostró, utilizando animales de laboratorio, que la exposición prenatal al alcohol afecta de forma más severa la respuesta al estrés, con una respuesta más prolongada en el cortisol plasmático en hembras que en machos. Posteriormente, McCormick et al. (1995) condujeron un

experimento en el que sometieron a ratas gestantes a estrés durante la última semana de gestación y demostraron que el estrés prenatal alteraba la respuesta al estrés posnatal de la progenie de un modo sexo-dependiente. En concreto, estos autores observaron que las hembras nacidas de ratas estresadas durante la gestación experimentaron aumentos significativos en adenocorticotropina y corticosterona en respuesta a la inmovilización, mientras que estos efectos no se observaron entre machos.

Posteriormente, algunos trabajos comenzaron a indagar en los efectos sexo-dependientes de programación fetal por subnutrición o RCIU como modo de explicación para la incidencia diferencial de trastornos cardiovasculares observada entre personas de diferentes sexos. Es así que Adair et al. (2001) condujeron un estudio epidemiológico vinculando el nivel nutricional materno y el peso al nacer con la presión arterial en adolescentes y demostraron que la presión sistólica y diastólica se correlacionó de forma diferente con múltiples variables nutricionales maternas, dependiendo del sexo de los adolescentes. En la primera década de este siglo, Grigore et al. (2008) revisaron la literatura relacionada a efectos sexo-dependientes de programación fetal sobre los trastornos cardiovasculares en humanos y concluyeron que existe suficiente evidencia que indica que los factores ambientales negativos durante el desarrollo predisponen más a los varones que a las mujeres a la aparición de enfermedades cardiovasculares y que las diferencias podrían estar relacionadas con el efecto de las hormonas sexuales como moduladoras de la actividad de los sistemas reguladores de la presión arterial, en particular del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Conclusiones similares fueron presentadas posteriormente por Tomat y Salazar (2013), quienes revisaron la literatura sobre la programación fetal y la incidencia de las enfermedades cardiovasculares y renales y concluyeron que los varones y las mujeres exhiben diferencias fenotípicas en respuesta al mal ambiente uterino que se acompañan de diferencias en el grado de severidad cuando padecen enfermedades cardiovasculares y renales. Los efectos sexo-dependientes de programación fetal también han sido propuestos para explicar diferencias en la incidencia de otras enfermedades en humanos. De acuerdo con Klingmann et al. (2008), la mayor prevalencia de síndrome de fibromialgia en

mujeres puede asociarse con menores niveles de cortisol, los cuales se deberían a un déficit en la función de la corteza adrenal que podría originarse por la exposición a agentes nocivos durante la vida prenatal.

Por otra parte, algunos trabajos más recientes han comenzado a evaluar si estos efectos sexo-dependientes de programación fetal pueden no solo vincularse con la incidencia de ciertas enfermedades, sino también implicar diferencias en las capacidades de los individuos para crecer y desarrollarse. En ese sentido, Oyhenart et al. (2003) condujeron un experimento en el que indujeron RCIU mediante un procedimiento quirúrgico a ratas gestantes y evaluaron el desarrollo de sus crías y las posibilidades de compensar el retardo durante la vida posnatal. Concluyeron que una reducción en el flujo sanguíneo placentario afecta más en el desarrollo a machos que a hembras y que durante la vida posnatal, ante condiciones ambientales favorables, las hembras son más capaces de compensar los efectos adversos que los machos. Resultados similares fueron luego confirmados para humanos por Gohlke et al. (2009), quienes investigaron el patrón de crecimiento posnatal de niños nacidos con peso extremadamente bajo y demostraron que existe un patrón de crecimiento posnatal que depende del sexo del individuo: las niñas nacidas con bajo peso demostraron poder compensar y normalizar su índice de masa corporal a los dos años de edad, mientras que los varones se mantuvieron con índices alterados a esa misma edad. No obstante, a pesar de la evidencia antes expuesta y de la importancia que posee el crecimiento para la producción animal, son muy escasos los trabajos que hayan puesto atención en las diferencias entre sexos para responder a la programación fetal en animales productivos. Un grupo de investigadores españoles evaluaron los efectos de la subnutrición durante la gestación en cerdas ibéricas con resistencia a la leptina y obesidad, sometiendo a las hembras gestantes a una restricción del 50 % global desde el día 35 de gestación en adelante (Gonzalez-Bulnes et al., 2012). Con ese modelo los investigadores reportaron que la subnutrición afectó el crecimiento de la progenie y el desarrollo de los animales al nacer, pero, sin embargo, se caracterizó por inducir un efecto sexo-dependiente sobre las capacidades de exhibir un crecimiento posnatal compensatorio, de tal forma que las hembras nacidas de madres restringidas mostraron mayor potencial, pudiendo

compensar el RCIU entre el nacimiento y el destete, mientras que los machos nacieron más livianos y continuaron así al momento de ser destetados. Asimismo, algunos investigadores también han indicado posibles efectos sexo-dependientes de programación fetal sobre variables de calidad de carne en cerdos. Concretamente, Oksberg et al. (2013) reportaron que algunas variables de calidad de carne (pH y ternura instrumental) se ven afectadas positivamente por una nutrición materna reducida en proteínas en machos, mientras que estos efectos no se observaron en hembras. A su vez, algunos pocos trabajos en animales de producción y roedores de laboratorio han reportado también la posible existencia de cambios sexo-dependientes en las características fibrilares inducidos por programación fetal. De acuerdo con Daniel et al. (2007), la subnutrición materna reduce el diámetro fibrilar en el *longissimus* de corderos machos, pero no de las hembras, al tiempo que aumenta la proporción de fibras IIA en el *semitendinosus* de las hembras, pero no de los machos. Resultados similares fueron reportados por Mallinson et al. (2007), quienes demostraron que la subnutrición materna en ratas reduce el diámetro fibrilar en el *gastrocnemius* de machos, pero no de hembras. Más allá de estos antecedentes, en rumiantes productores de carne, los trabajos que han considerado el efecto del sexo en la programación fetal sobre el desempeño productivo o el desarrollo muscular son escasos y ofrecen información contradictoria. En la especie ovina, tanto reportes internacionales (Nordby et al. 1987) como nacionales (Piaggio et al. 2018) han indicado la inexistencia de efectos dependientes del sexo en la programación fetal por subnutrición sobre el crecimiento del cordero, el desarrollo muscular, la calidad de la carcasa y la calidad de la carne. No obstante, Daniel et al. (2007) incluyeron el efecto del sexo de la cría en la evaluación de la programación fetal en ovinos y reportaron que la subnutrición gestacional reduce el peso del músculo *longissimus dorsi* en corderos machos y no en hembras. A nivel nacional, Luzardo et al. (2019) realizaron un experimento en el que evaluaron la restricción energética gestacional sobre variables productivas, de calidad de canal y carne en corderos. No encontraron efectos dependientes del sexo para las variables peso al nacer y peso al destete, aunque reportaron una tendencia a una interacción entre la nutrición materna y el sexo de la cría para la ganancia predestete. Lamentablemente, los autores no

presentaron la separación de medias según la interacción entre tratamiento y sexo para esta variable, restándole importancia a estos hallazgos. Por otra parte, a pesar de que evaluaron efectos sobre calidad de carcasa y de carne, utilizaron solo corderos machos. De hecho, la utilización de animales de un solo sexo, o bien la eliminación del factor sexo de los modelos estadísticos, es algo frecuente cuando se revisan los trabajos sobre programación fetal y desarrollo de rumiantes para producción de carne. Por ejemplo, Sibbald y Davidson (1998) evaluaron los efectos de la subnutrición en ovejas gestantes sobre variables productivas en corderos, reportando resultados de dos experimentos independientes en el que estudiaron a los machos en uno y a las hembras en otro. Krausgrill et al. (1999) estudiaron el efecto de la restricción nutricional durante la gestación temprana sobre diversas variables de desarrollo y productivas y no incluyeron para el análisis el efecto del sexo de los corderos. Sen et al. (2015) estudiaron el impacto de la nutrición materna sobre el desarrollo muscular y la calidad de carne de corderos de 150 días de vida, pero, a pesar de que utilizaron corderos de ambos sexos, usaron el sexo como cofactor en el modelo estadístico para eliminar su efecto. Algo similar ocurre en bovinos: la mayoría de los trabajos de programación fetal, crecimiento, desarrollo muscular y calidad de carne utilizan animales de un solo sexo (Alvarenga et al., 2016, Maresca et al., 2019, Ramírez et al., 2020). Incluso en un trabajo muy reciente realizado en Estados Unidos, vuelve a evidenciarse falta de interés por determinar el efecto del sexo en este tipo de estudios (Gardner et al., 2021). Estos investigadores evaluaron el impacto de una dieta restrictiva durante la gestación media en vacas, incluyendo en la progenie evaluada a machos y hembras. En este caso, los autores no incluyeron el efecto del sexo como factor principal en el análisis, sino como cofactor, argumentando, además, que no existieron diferencias entre animales de los diferentes sexos en las variables de respuesta en análisis preliminares.

En síntesis, podemos afirmar que a pesar de que existe suficiente evidencia de que los efectos de programación fetal sobre el desarrollo de diversos órganos y el crecimiento pueden variar en función del sexo de la progenie, la mayoría de los trabajos realizados en animales de producción no consideran al factor sexo en los enfoques experimentales.

## **2. EFECTO DE UNA MENOR OFERTA DE FORRAJE DE CAMPO**

### **NATURAL DURANTE LA GESTACIÓN SOBRE LA MIOGÉNESIS FETAL**

MATERNAL UNDERNUTRITION AFFECTS SECONDARY MYOGENESIS IN A MUSCLE DEPENDENT WAY ACROSS THE MAJOR MUSCLES OF 70-DAY OLD OVINE FETUSES. 2020. Javier Ithurrealde, Patricia Genovese, María José Abud, Álvaro López-Pérez, Raquel Pérez-Clariget, Alejandro Bielli. Artículo publicado en la revista *Small Ruminant Research*.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de una subnutrición inducida mediante una menor oferta de forraje de campo natural desde antes de la concepción hasta el día 70 de gestación sobre la formación de los precursores fibrilares y la expresión de diferentes factores reguladores miogénicos en distintos músculos de fetos ovinos de 70 días de desarrollo. El trabajo está enmarcado en lo que fue el experimento número 1 de la tesis, cuya etapa de campo se realizó en la Estación Experimental Bernardo Rosengurt de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República (Udelar), Uruguay (32° S, 54° W) entre marzo y septiembre de 2013. Brevemente, el experimento consistió en someter a dos grupos de ovejas ( $n = 18$  para cada grupo) a dos ofertas de forraje de campo natural contrastantes (alta oferta = 10 a 12 kg MS/100 kg de PC por día y baja oferta = 5 a 8 kg MS/100 kg de PC por día) desde 23 días previos a la concepción hasta el día 70 de gestación. Al día 70 de gestación las ovejas fueron sacrificadas en forma humanitaria, se extrajo el útero grávido y se tomaron muestras fetales para evaluar el desarrollo en los músculos *semitendinosus*, *gluteus medius*, *gluteobiceps*, *semimembranosus*, *psoas major* y *longissimus lumborum*. Los resultados obtenidos demostraron que una subnutrición inducida por una menor oferta de forraje de campo natural produjo un marcado efecto negativo sobre la miogénesis secundaria, reduciendo la cantidad de fibras fetales secundarias formadas así como la cantidad de núcleos por fibra y la proporción de tejido muscular. A su vez, los resultados también sugieren que esta reducción podría estar asociada a una menor actividad mitótica y de fusión mioblástica observada en algunos músculos de los animales gestados por

las ovejas subnutridas y, además, que algunos de estos efectos podría variar dependiendo del músculo en cuestión. La relevancia de estos hallazgos reside en que todas las características afectadas son decisivas para el desarrollo muscular y el crecimiento posnatal: las fibras fetales secundarias son las que mayoritariamente darán origen a las células musculares maduras, y la cantidad de núcleos por fibra formada incidirá fuertemente sobre las posibilidades hipertróficas que tendrá esa fibra *a posteriori* en la vida posnatal. Además, estos hallazgos se confirman a los 70 días de gestación, momento aproximado en el que la hiperplasia mioblástica se detiene y estas características quedan definidas. Por ende, los resultados del trabajo indican que una menor oferta de forraje de campo natural desde antes de la concepción hasta el día 70 de gestación determina una importante limitación futura para el crecimiento muscular y la producción de carne ovina.



Contents lists available at ScienceDirect

Small Ruminant Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/smallrumres](http://www.elsevier.com/locate/smallrumres)

# Maternal undernutrition affects secondary myogenesis in a muscle-dependent way across the major muscles of 70-day old ovine fetuses

Javier Ithurrealde<sup>a,\*</sup>, Patricia Genovese<sup>b</sup>, María José Abud<sup>a</sup>, Álvaro López-Pérez<sup>a</sup>, Raquel Pérez-Clariget<sup>a</sup>, Alejandro Bielli<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Garzón 780, 12900, Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup> Departamento de Morfología y Desarrollo, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, A. Las Plazas, 1550, 11600, Montevideo, Uruguay

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Fetal programming  
Sheep  
Myogenesis  
Immunohistochemistry  
Myogenic regulatory factors

## ABSTRACT

The present study evaluated the effects of maternal undernutrition induced by a lower natural pasture allowance from 23 days before conception on the distribution and morphometry of muscle precursor cells and the expression of *PCNA*, *Myogenin* and *Pax 7* in muscles *Psoas major*, *Longissimus lumborum*, *Semimembranosus*, *Semimembranosus*, *Gluteobiceps* and *Gluteus medius* of 70-day old sheep fetuses. Ewes were assigned to two nutritional treatments (complete randomized block design) beginning 23 days before conception: High pasture allowance (HPA) ewes grazed on natural grasslands at 10–12 kg dry matter (DM) /100 kg of live weight (LW)/day, while low pasture allowance (LPA) ewes grazed at 5–8 kg DM /100 kg of LW/day. On day 70 of pregnancy 18 ewes (nine/treatment) carrying single male fetuses were euthanized and samples were taken from fetal muscles. Samples were stained with hematoxylin-eosin to evaluate muscle morphology and treated with immunohistochemical methods to evaluate the expression of myogenic regulatory factors. Maternal undernutrition reduced the ratio of secondary to primary fibers ( $P < 0.03$ ) and the number of nuclei/fasciculi ( $P < 0.05$ ) in all muscles but the *Gluteus medius*. Maternal undernutrition reduced the proportion of muscle tissue in all muscles ( $P < 0.02$ ) but the *Psoas major*, and reduced *PCNA* expression in muscles *Longissimus lumborum* ( $P = 0.01$ ) and *Gluteobiceps* ( $P < 0.01$ ) and tended to reduce it in muscle *Gluteus medius* ( $P = 0.08$ ). A lower pasture allowance tended to increase ( $P = 0.07$ ) the mean number of *Pax 7* positive nuclei per fascicle in the *Psoas major*, while it reduced the number of *Myogenin* positive nuclei per fascicle in the *Gluteus medius* ( $P = 0.02$ ). Our results suggest that a lower maternal pasture allowance during early to mid gestation affects secondary myogenesis and myoblast mitotic and fusion activity in a muscle-dependent way with possible future effects over meat-producing performance.

## 1. Introduction

In sheep, myogenesis follows a biphasic developmental pattern with two main generations of muscle precursor cells: primary myotubes and secondary fetal fibers (Ashmore et al., 1972; Wilson et al., 1992). Primary myotubes are formed until approximately day 38 of gestation and give rise to a reduced proportion of mature fibers, while secondary fibers continue to develop until approximately day 70 of gestation and account for most of the adult muscle cell population (Wilson et al., 1992; Picard et al., 2002). Primary myotube number is mainly determined by genetic factors, while secondary fiber formation is controlled by epigenetic and environmental factors, such as maternal nutrition during gestation (Picard et al., 2002). Both primary and secondary fetal fibers are derived from myoblasts which proliferate,

fuse to form multinucleated myotubes and finally differentiate into muscle fibers (Picard et al., 2002). Myoblast fusion is an irreversible process whereby these progenitor cells become part of a new cellular syncytium, losing their mitotic capacity, and therefore stopping their contribution to muscle hyperplasia (Kitzmann and Fernandez, 2001). Pre-fusion myoblast mitotic activity can be evidenced by the expression of the proliferating cell nuclear antigen (*PCNA*) (Yates et al., 2014). Furthermore, the expression of the myogenic regulatory factor (MRF) *Myogenin* is known to be an indicator of myoblast fusion (Barnoy and Kosower, 2007), while the expression of paired box protein 7 (*Pax 7*) indicates the presence of undifferentiated myoblasts (with preserved mitotic capacity) which have not reached their terminal differentiation (Zammit et al., 2006).

Although attention has been paid to maternal nutrition effects on

\* Corresponding author.

E-mail address: [javiithu@gmail.com](mailto:javiithu@gmail.com) (J. Ithurrealde).

<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106174>

Received 18 September 2019; Received in revised form 9 June 2020; Accepted 16 June 2020

Available online 20 June 2020

0921-4488/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

myogenesis of meat producing animals, studies evaluating fetal programming effects on secondary fiber formation, myoblast proliferation and differentiation during the key stage for sheep muscle development are somewhat contradictory and limited to a reduced number of muscles. Maternal undernutrition reduced the number of secondary fibers in the *Longissimus* muscle of 70-day old ovine fetuses (Zhu et al., 2004). Similarly, restricting feed intake during the periconceptional period reduced the number of secondary fibers in the *Semitendinosus* of 75-day old sheep fetuses (Quigley et al., 2005). On the contrary, Quigley et al. (2015) found no differences between small and large sheep fetuses regarding the number of secondary fibers in the *Semitendinosus* muscle of near-term fetuses. Besides, Sen et al. (2016) reported that maternal undernutrition during the periconceptional period tended to reduce the number of secondary fibers in the *Semitendinosus* but not in the *Longissimus* muscle of 90-day old sheep fetuses, suggesting that fetal programming effects on early myogenesis might vary between muscles. Otherwise, both Yates et al. (2014) and Greenwood et al. (1999) associated maternal undernutrition with reduced mitotic activity of muscle satellite cells from near-term sheep fetuses. Nevertheless, although myoblast mitotic state before the end of secondary fiber formation (around day 70 of gestation) is a key event for sheep myogenesis, as far as we know, no previous study has evaluated the effect of maternal undernutrition on the mitotic state and the expression of MRFs in fetal myoblasts from different sheep muscles at this stage of development.

Furthermore, we have recently demonstrated that a reduced forage allowance offered to pregnant ewes from early gestation until lambing affects muscle weight in a sex and muscle-dependent manner. Generally, only male lambs born to undernourished ewes showed reduced weights of muscles *Gluteobiceps*, *Supraspinatus* and *Semitendinosus*, while muscles *Gluteus medius*, *Seminembranosus*, *Longissimus lumborum* and *Psoas major* were not affected by maternal undernutrition (Ithurralde et al., 2019). Moreover, we previously hypothesized that this muscle-dependent weight reduction could be associated with reduced secondary fetal fiber formation as well as with intermuscular differences in the timing of development. Therefore, the present study aimed to explore whether early maternal undernutrition induced by a lower natural pasture allowance affects secondary fetal fiber formation as well as the expression of *PCNA*, *Myogenin* and *Pax 7* in different muscles of 70-day old sheep male fetuses.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Location, animals and experimental design

The experiment was carried out at the Estación Experimental Bernardo Rosengurt (Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay). All procedures were carried out in accordance with the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments and were approved by the Animal Experimental Committee of the UdelaR (Comité de ética en el uso de animales, No. 021,130-001,038-16). The experimental design has been previously described (Freitas de Melo et al., 2015). Briefly, 36 multiparous Corriedale ewes with an initial live weight (LW) and body condition score (BCS, scale: 5 = obese; 1 = emaciated) of  $48.9 \pm 0.3$  kg and  $2.74 \pm 0.02$ , respectively were used in a complete randomized block design consisting of three plots and two nutritional treatments. Twenty three days before artificial insemination (AI), animals were randomly assigned to two nutritional treatments that consisted of high (HPA,  $n = 18$ ) and low (LPA,  $n = 18$ ) native pasture allowances. HPA ewes grazed on natural grasslands at 10 (March-June) - 12 (July) kg dry matter (DM) /100 kg of LW/day, while LPA ewes grazed on the same three blocks of natural grasslands but at 5 (March-June) - 8 (July) kg DM /100 kg of LW/day. Pasture allowances were adjusted every month based on pasture mass measurements (Haydock and Shaw, 1975) and by including or removing ewes according to the "put-and-take" method. Pasture chemical composition (ashes, crude

protein, neutral and acid detergent fiber) as well as pasture intake were calculated according to Van Soest et al. (1991) and were previously reported (Abud, 2015). Moreover, the energy and protein balance were estimated considering the energy and protein requirements, obtained from the 2007 and 1985 NRC tables, and were previously reported (Abud, 2015). Estimated energy balance always remained over 100 % in the HPA ewes (136, 126 and 102 %, on days -23 to 24, 25-58 and 59-70 of gestation, respectively), but not in the LPA ewes (106, 83 and 74 % on days -23 to 24, 25-58 and 59-70 of gestation, respectively). Estimated protein balance was 108, 99 and 83 % for HPA ewes on days -23 to 24, 25-58 and 59-70 of gestation, respectively, and 102, 70 and 67 % for LPA ewes on days -23 to 24, 25-58 and 59-70 of gestation, respectively (Abud, 2015). Ewes were estrus synchronized and pericervically inseminated with fresh semen from three Corriedale rams 12 h after estrus detection (day 0). Thirty days later, pregnancy and number of fetuses were determined using transrectal ultrasound (AlokaProSound 2, Aloka Co., Ltd., Tokio, Japan, 7.5 Mhz probe). Fetal sex was also determined by transrectal ultrasound at day 60, and ten days later (day 70 of pregnancy), 18 ewes (nine/treatment, three/plot) carrying single male fetuses were euthanized using a captive bolt pistol followed by immediate exsanguination. After slaughtering sheep, fetuses remained in the gravid uterus for at least 5 min and then were immediately euthanized.

### 2.2. Ewes' records

Ewes' LW and BCS were recorded on days -23 (beginning of treatments), 0 (day of AI), 24, 58 and 70 (previous to sacrifice), and were previously reported (Abud, 2015). At slaughter, the HPA mothers were 7% heavier and had 15 % greater BCS than the LPA ewes ( $P < 0.05$ ) (Abud, 2015). Ewes' blood samples were taken from the jugular vein at the beginning of the experiment (day -23) and before euthanasia (day 70) and concentrations of insulin and insulin growth factor type I (IGF-I) were determined. All samples were centrifuged (3000 g, 10 min) within the first hour after collection, and plasma was recovered and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . 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  $\mu\text{IU/mL}$ , the intra assay coefficient of variation for the low control (17.5  $\mu\text{IU/mL}$ ) and high control (101.5  $\mu\text{IU/mL}$ ) 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 %.

### 2.3. Fetal records and muscle sampling

Fetal carcass weight was recorded after removing its head and all its internal organs and was previously reported (Abud, 2015). Carcasses from HPA fetuses tended ( $P = 0.08$ ) to be heavier than those from the LPA group ( $151.3 \pm 5.2$  g vs.  $143.9 \pm 5.1$  g). Immediately after recording fetal carcass weight, samples were taken from the dorsolumbar and left hindlimb regions, fixed in 4% buffered formaldehyde, transferred to 70 % ethanol and individual muscle samples were taken from each region. Samples from muscles *Longissimus lumborum* and *Psoas major* were dissected from dorsolumbar samples, while samples from *Gluteobiceps*, *Semitendinosus*, *Seminembranosus* and *Gluteus medius* were obtained from the hindlimb region.

### 2.4. Histological determinations in fetal muscles

Samples were embedded in paraffin wax through standard histological techniques and 6  $\mu\text{m}$  thick sections were obtained from the center of each sample (microtome model 2030 Reichert-Jung, MIN, USA). Samples (one sample/muscle per animal) were stained with

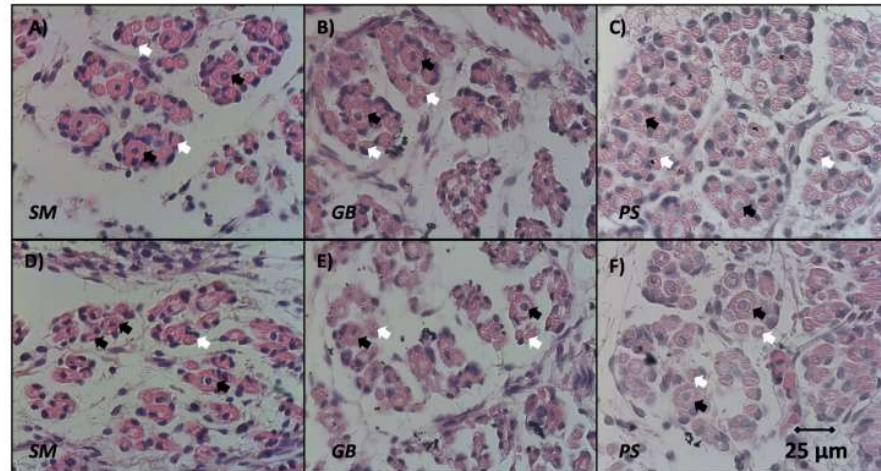


Fig. 1. Histological transverse sections of muscles *Semimembranosus* (SM), *Gluteobiceps* (GB), and *Psoas major* (PS) from 70 day old HPA (A, B and C) and LPA (D, E and F) sheep fetuses. Sections were stained with hematoxylin and eosin. Black and white arrows show primary myotubes and secondary fibers, respectively.

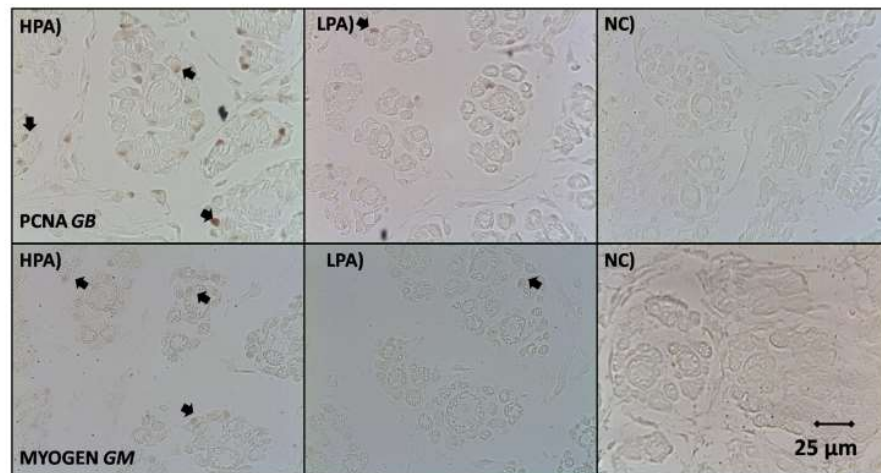


Fig. 2. Immunohistochemical localization of *Myogenin* (MYOGEN) and *PCNA* in muscles *Gluteus medius* (GM) and *Gluteobiceps* (GB) from high pasture (HPA) and low pasture allowance (LPA) sheep fetuses. Black arrows show positive nuclei. NC: Negative control.

hematoxylin-eosin to evaluate muscle morphology. Morphometric analyses were carried out using an image analysis system (Infinity analyze®, Toronto, Canada). The number of primary myotubes and fetal secondary fibers were counted on 30 muscle fascicles of each sample (Fig. 1), and the mean ratio of secondary to primary fibers was reported (Zhu et al., 2004). Only those fascicles for which primary myotubes and secondary fibers were clearly differentiated were counted. Also, primary and secondary fiber diameter was calculated as the mean from 30 transversal fiber sections. A reference grid containing 120 points was overlaid on eight pictures from each muscle and animal and the number of points hitting muscle or non-muscle tissue was used to calculate the proportion of muscle and non muscle tissues. The number of nuclei/fascicle was also counted on 30 muscle fascicles of each sample, and the mean number of nuclei per fascicle was reported.

## 2.5. Immunohistochemical determination of Pax 7, Myogenin and PCNA in fetal muscles

Histological sections (6 μm) were de-waxed, re-hydrated and then steamed for 30 min in Borg Decloaker, RTU, pretreatment reagent (Biocare Medical, Walnut Creek, CA, USA) for antigen retrieval. After cooling for 20 min, slides were washed in TBS Automation Washing Buffer (Biocare Medical, Walnut Creek, CA, USA), and endogenous peroxidase activity was blocked with PeroxiDazed 1 (Biocare Medical, Walnut Creek, CA, USA) for 5 min at room temperature. All slides from the same muscle were processed in one batch. Primary anti-PCNA antibody (1:50; mouse anti-PCNA monoclonal antibody Clone PC10, Dako, Carpinteria, CA, USA), anti-Myogenin mouse monoclonal (1:10; F5D; DSHB, University of Iowa, Iowa City, IA, USA) and anti-Pax 7

mouse monoclonal (1:10; PAX 7; DSHB, University of Iowa, Iowa City, IA, USA), were used in order to immunohistochemically label proliferating, differentiated and undifferentiated myoblasts, respectively (Yates et al., 2014). The F5D primary anti-Myogenin antibody was deposited to the DSHB by Wright, W.E. (DSHB Hybridoma Product F5D). The Pax7 primary antibody was deposited to the DSHB by Kawakami, A. (DSHB Hybridoma Product PAX7). After 1 h of room temperature primary antibody incubation, sections were washed and incubated for 30 min at room temperature with Mouse on Rat Horseradish Peroxidase (HRP) polymer kit (Biocare Medical, Walnut Creek, CA, USA). Peroxidase labeling was then revealed using a liquid diaminobenzidine substrate-chromagen system (Dako, Carpinteria, CA, USA) for 7.5 min. Negative controls (without primary antibody) were included for each muscle and each protein and none of them showed any staining (Fig. 2). The number of positive Pax 7, PCNA and Myogenin nuclei was determined for 50 randomly selected developing muscle fascicles from each muscle and each animal, and was expressed as the mean number from all determinations. Also, the proportion from all PCNA positive nuclei located in the muscle tissue or in the interstitium was calculated from five randomly selected microscope fields/muscle per animal.

## 2.6. Statistical analysis

Data were analyzed in a completely randomized block design (by topography) using the SAS Systems software (SAS 9.0 V; SAS Institute, Cary, NC, USA). Two treatments were applied (HPA and LPA) in three blocks and six plots (three plots per treatment). Data were analyzed using a mixed model (PROC MIXED). The adjusted model included forage allowance (HPA vs. LPA) as fixed effects and the block as the random effect. The interaction between treatment and block was included in the models as random effect but it was removed from them when the estimate of the covariance parameter was zero or near zero. Ewes' plasma hormone concentrations were analyzed as repeated measures using the MIXED procedure (PROC MIXED) with day of gestation as the repeated effect. The model included the treatment (HPA vs. LPA), day of gestation and their interactions as fixed effects and the block as the random effect. Data are expressed as least square means  $\pm$  SEM. Means were considered to differ when  $P \leq 0.05$ , and trends were identified when  $0.05 < P \leq 0.10$ .

## 3. Results

### 3.1. Plasma hormone concentration in ewes

Plasma concentration of insulin tended ( $P = 0.10$ ) to be higher in HPA ( $16.90 \pm 2.8$   $\mu$ U/mL) than in LPA ewes ( $9.10 \pm 3.1$   $\mu$ U/mL). Plasma concentration of IGF-I was affected neither by forage allowance (HPA =  $113.25 \pm 9.5$  ng/mL vs LPA =  $113.43 \pm 9.1$  ng/mL;  $P = 0.99$ ) nor by day of gestation ( $P = 0.37$ ).

### 3.2. Distribution and morphometry of muscle precursor cells in fetal muscles

A lower pasture allowance reduced the ratio of secondary to primary fibers ( $P < 0.03$ ) as well as the number of nuclei/fascicle ( $P < 0.05$ ) in all the studied muscles but the *Gluteus medius* (Table 1 and Fig. 1). The mean diameter of secondary fibers was not affected in any of the studied muscles by nutritional treatment. However, the mean diameter of primary myotubes was affected by pasture allowance only in the *Semitendinosus* muscle ( $P = 0.04$ ) (Table 1). A lower pasture allowance reduced the proportion of muscle tissue in all the studied muscles ( $P < 0.02$ ) but the *Psoas major* (Table 1 and Fig. 1).

### 3.3. Immunohistochemical expression of PCNA, Myogenin and Pax 7 in fetal muscles

A lower pasture allowance reduced the mean number of positive

PCNA nuclei per fascicle in both the *Longissimus lumborum* ( $P = 0.01$ ) and the *Gluteobiceps* ( $P = 0.0006$ ) muscles (Table 2 and Fig. 2). Also, a lower pasture allowance tended to reduce the mean number of positive PCNA nuclei per fascicle in the *Gluteus medius* muscle ( $P = 0.08$ ; Table 2). A lower pasture allowance tended to increase ( $P = 0.07$ ) the mean number of Pax 7 positive nuclei per fascicle in the *Psoas major* (Table 2), while it reduced the mean number of Myogenin positive nuclei per fascicle in the *Gluteus medius* ( $P = 0.02$ ; Table 2 and Fig. 2).

## 4. Discussion

### 4.1. Maternal undernutrition effects on secondary myogenesis

The present study demonstrates that early maternal undernutrition induced by a reduced pasture allowance from 23 days before conception affects secondary myogenesis in 70-day old sheep fetuses in a muscle-dependent manner. Generally, our finding that maternal undernutrition reduced the ratio of secondary to primary fibers in most of the studied muscles confirms that secondary myogenesis is mainly controlled by environmental factors, such as maternal nutrition during gestation (Dwyer et al., 1994; Picard et al., 2002; Zhu et al., 2004; Quigley et al., 2005; Tilley et al., 2007). These results are of paramount importance since secondary fibers account for most of the adult muscle cell population (Picard et al., 2002) and therefore, a reduction in secondary fiber number at the approximate end date of secondary sheep myogenesis might imply future permanent effects over adult muscle characteristics. Furthermore, this secondary myogenesis reduction might also lead to a compensatory increase in the mean diameter of adult fibers during the hypertrophic stage of myogenesis (Fahey et al., 2005; Reed et al., 2014). This is an important consideration, since differences in meat quality between the major muscles of the sheep carcass can be mainly explained by differences in fiber sizes (Ithurralde et al., 2018). Similarly, the increase in the proportion of non-muscular tissues found in most muscles from LPA fetuses in the present study is also relevant since it might imply future negative effects over animal productive performance and meat quality (Purslow, 2005). The reduction in the proportion of muscle tissue found in LPA fetuses is generally consistent with Zhu et al. (2004) and might be explained not only by the reduction in the number of secondary fibers developed, but also by the competitive relationship that exists between myogenesis, adipogenesis and fibrogenesis during embryonic life. Since all of these cell lines are derived from the same mesenchymal cells, it has been suggested that undernutrition during fetal development would limit myogenesis, thus favoring adipogenesis and fibrogenesis (Du et al., 2015). Therefore, our present findings suggest that a low forage allowance during early to mid-sheep gestation could lead to a significant reduction in muscle mass which could negatively affect future animal meat productive performance.

### 4.2. Maternal undernutrition effects on the expression of PCNA, Myogenin and Pax 7 in fetal muscles

In the present study, a reduced maternal forage allowance starting before conception affected the mitotic activity of fetal myoblasts in muscles *Gluteus medius*, *Gluteobiceps* and *Longissimus lumborum*. This is an important finding, since myoblast proliferation is a key factor determining the future number of muscle fibers that an animal will have. Moreover, evaluating fetal programming effects on myoblast mitotic activity at day 70 of gestation in fetal sheep muscles is particularly relevant, since from this date on secondary myogenesis is supposed to end (Wilson et al., 1992; Picard et al., 2002; Fahey et al., 2005). Accordingly, most myoblasts will have abandoned their mitotic cycles and therefore will have stopped contributing to muscle hyperplasia. Furthermore, myoblast proliferation not only affects future muscle mass by increasing the number of formed fetal precursor muscle cells but also influences the number of myonuclear accumulation via myoblast

**Table 1**  
Histological traits (mean  $\pm$  SEM secondary to primary fiber ratios, primary and secondary fiber diameters, nuclei per fascicle and proportion of muscle tissue) in muscles *Psoas major*, *Longissimus lumborum*, *Gluteus medius*, *Gluteobiceps*, *Semimembranosus* and *Semitendinosus* of 70-day old HPA and LPA fetuses.

| Muscle                      | Secondary to primary fiber ratio |                              | P value | Primary fiber mean diameter ( $\mu$ m) |                              | P value | Secondary fiber mean diameter ( $\mu$ m) |                 | P value | Mean nuclei number per fascicle |                              | P value | Proportion of muscle tissue (%) |                               | P value |
|-----------------------------|----------------------------------|------------------------------|---------|----------------------------------------|------------------------------|---------|------------------------------------------|-----------------|---------|---------------------------------|------------------------------|---------|---------------------------------|-------------------------------|---------|
|                             | HPA                              | LPA                          |         | HPA                                    | LPA                          |         | HPA                                      | LPA             |         | HPA                             | LPA                          |         | HPA                             | LPA                           |         |
| <i>Psoas major</i>          | 8.78 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>     | 5.65 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup> | 0.03    | 11.38 $\pm$ 0.46                       | 11.85 $\pm$ 0.46             | 0.30    | 7.15 $\pm$ 0.31                          | 6.45 $\pm$ 0.31 | 0.27    | 11.50 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>   | 8.49 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup> | 0.03    | 46.86 $\pm$ 2.48                | 42.86 $\pm$ 2.33              | 0.27    |
| <i>Longissimus lumborum</i> | 7.81 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>     | 5.26 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup> | < 0.001 | 9.74 $\pm$ 0.34                        | 8.94 $\pm$ 0.34              | 0.12    | 5.60 $\pm$ 0.11                          | 5.35 $\pm$ 0.11 | 0.13    | 11.8 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>    | 7.4 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>   | < 0.001 | 32.6 $\pm$ 2.00 <sup>a</sup>    | 25.7 $\pm$ 2.00 <sup>b</sup>  | 0.007   |
| <i>Gluteus medius</i>       | 4.81 $\pm$ 0.43                  | 4.44 $\pm$ 0.43              | 0.19    | 10.47 $\pm$ 0.49                       | 10.59 $\pm$ 0.48             | 0.77    | 6.37 $\pm$ 0.24                          | 6.42 $\pm$ 0.23 | 0.89    | 7.32 $\pm$ 0.48                 | 7.71 $\pm$ 0.47              | 0.28    | 52.57 $\pm$ 3.64 <sup>a</sup>   | 44.58 $\pm$ 3.63 <sup>b</sup> | 0.008   |
| <i>Gluteobiceps</i>         | 7.92 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>     | 4.44 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup> | 0.03    | 11.08 $\pm$ 0.66                       | 9.86 $\pm$ 0.63              | 0.30    | 6.54 $\pm$ 0.26                          | 5.86 $\pm$ 0.25 | 0.20    | 12.67 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>   | 8.52 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup> | 0.048   | 49.85 $\pm$ 1.81 <sup>a</sup>   | 36.10 $\pm$ 1.71 <sup>b</sup> | < 0.001 |
| <i>Semimembranosus</i>      | 8.41 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>     | 4.74 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup> | 0.024   | 9.71 $\pm$ 0.43                        | 9.63 $\pm$ 0.40              | 0.94    | 5.61 $\pm$ 0.28                          | 6.02 $\pm$ 0.26 | 0.40    | 13.59 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>   | 9.51 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup> | 0.038   | 45.08 $\pm$ 1.98 <sup>a</sup>   | 37.68 $\pm$ 1.87 <sup>b</sup> | 0.02    |
| <i>Semitendinosus</i>       | 7.77 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>     | 4.27 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup> | < 0.001 | 8.19 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>           | 7.42 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup> | 0.04    | 5.36 $\pm$ 0.21                          | 5.16 $\pm$ 0.21 | 0.42    | 9.9 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>     | 5.9 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>  | < 0.001 | 48.2 $\pm$ 3.40 <sup>a</sup>    | 33.1 $\pm$ 3.40 <sup>b</sup>  | 0.007   |

Within the same muscle and trait, those means followed by different superscripts were different ( $P < 0.05$ ).

incorporation, which is known as a key factor affecting future muscle protein synthesis and hypertrophic ability (Allen et al., 1979). Indeed, we also found a reduction in the mean number of myonuclei per fascicle in most muscles from LPA fetuses. Our findings regarding the mitotic activity of fetal myoblasts are consistent with Yates et al. (2014) who reported that cultured myoblasts from undernourished sheep fetuses exhibit reduced proliferating rates. Furthermore, these authors also found reduced PCNA positive cells in the *Semitendinosus* muscle from 135-day old undernourished sheep fetuses (Yates et al., 2014). Additionally, our results are also consistent with Greenwood et al. (1999) who associated retarded myogenesis with decreased cell cycle activity in the *Peroneus longus* muscle from sheep fetuses. Nevertheless, unlike our present study, in which myoblast mitotic activity was evaluated at a key moment for secondary sheep myogenesis, both previous studies (Yates et al., 2014; Greenwood et al., 1999) evaluated mitotic activity in satellite cells from near-term fetuses. The reduced number of PCNA positive myoblasts found in some muscles from LPA fetuses in the present study could be related to a reduction in their intrinsic mitotic activity. As a matter of fact, Yates et al. (2014) demonstrated that replication of myoblasts from undernourished sheep fetuses is independent from different serum-supplemented cell culture media, suggesting that their lower mitotic capacity might be an intrinsic cellular defect. Nevertheless, our results regarding PCNA expression might also be associated with a developmental delay in muscle differentiation and an extension in myogenic proliferative phase in HPA fetuses. Myoblasts' commitment to cell fusion and muscle differentiation requires prior cell cycle irreversible withdrawal, which implies choosing between progressing through a new division cycle or finally differentiating into a postmitotic myotube (Kitzmann and Fernandez, 2001). The regulation in the balance between proliferation and differentiation of myoblasts is under several cell cycle regulators whose expression is known to be affected by maternal nutrition (Ciemerych et al., 2011; Yates et al., 2014; Zou et al., 2017). Therefore, the differences in PCNA levels of expression found in the present study might be due to an extension in the proliferative phase experimented by HPA fetuses. This theory is consistent with Zou et al. (2016) who suggested that a higher gestational energy supply delays myoblast differentiation and maturation, while it extends its proliferative phase in the *Longissimus* muscle from pig fetuses. This is also consistent with Raja et al. (2016) who reported that nutrient restriction during gestation alters the temporal expression of *MyoD* and *Myogenin* in cultured satellite cells, which decreases the amount of time spent in the proliferative stage of myogenesis by these cells.

Moreover, the present study also aimed to evaluate the expression of *Myogenin* as a marker of the end of the proliferating phase and myoblast fusion (Barnoy and Kosower, 2007) as well as the expression of *Pax 7* as a marker of undifferentiated myoblasts. The only found effect regarding *Myogenin* expression in the present study was an increase in the mean number of positive *Myogenin* nuclei in the *Gluteus medius* muscle of HPA fetuses. *Myogenin* levels of expression were found to be reduced in the *Semitendinosus* muscle of 135-day old undernourished sheep fetuses (Yates et al., 2014) as well as in the *Longissimus* muscle of undernourished pig fetuses (Zou et al., 2017). This finding might indicate a reduction in the fusing activity of myoblasts from LPA fetuses. In point of fact, Raja et al. (2016) reported that maternal undernutrition decreases fusion index in cultured cells isolated from undernourished lambs. On the other hand, consistently with previous reports in sheep fetuses (Yates et al., 2014; Raja et al., 2016) in the present study, maternal undernutrition did not affect the expression of *Pax 7*, and only a trend for an increase in the number of *Pax 7* positive cells was found in the *Psoas major* from LPA fetuses. Generally, controversy exists regarding the maintenance of the *Pax 7* positive cells in intrauterine growth restricted muscles (Woo et al., 2011; Yates et al., 2014; Raja et al., 2016). Furthermore, previous reports have attributed these differences to the variety of cells (differentiated myonuclei and other vascular or immune cells) that can also express *Pax 7* (Soto et al., 2017).

**Table 2**  
Immunohistochemical traits (mean  $\pm$  SEM) Myogenin, Pax 7 and PCNA positive nuclei per fascicle and proportion of PCNA positive nuclei in muscle and non muscle tissue) in muscles *Psoas major*, *Longissimus lumborum*, *Gluteus medius*, *Gluteobiceps*, *Semimembranosus* and *Semitendinosus* of 70-day old HPA and LPA fetuses.

| Muscle                      | Myogenin positive nuclei per fascicle |                              | P value | PCNA positive nuclei per fascicle |                              | P value | Proportion of PCNA positive nuclei in muscle tissue |                  | P value | Proportion of PCNA positive nuclei in non muscle tissue |                  | P value | Pax 7 positive nuclei per fascicle |                              | P value |
|-----------------------------|---------------------------------------|------------------------------|---------|-----------------------------------|------------------------------|---------|-----------------------------------------------------|------------------|---------|---------------------------------------------------------|------------------|---------|------------------------------------|------------------------------|---------|
|                             | HPA                                   | LPA                          |         | HPA                               | LPA                          |         | HPA                                                 | LPA              |         | HPA                                                     | LPA              |         | HPA                                | LPA                          |         |
| <i>Psoas major</i>          | 0.43 $\pm$ 0.16                       | 0.76 $\pm$ 0.16              | 0.13    | 4.62 $\pm$ 0.22                   | 3.85 $\pm$ 0.23              | 0.14    | 74.49 $\pm$ 1.24                                    | 73.16 $\pm$ 1.27 | 0.53    | 25.51 $\pm$ 1.24                                        | 26.84 $\pm$ 1.27 | 0.53    | 1.57 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>       | 3.25 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup> | 0.07    |
| <i>Longissimus lumborum</i> | 0.51 $\pm$ 0.07                       | 0.61 $\pm$ 0.06              | 0.29    | 2.58 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>      | 1.78 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup> | 0.01    | 85.72 $\pm$ 1.55                                    | 84.53 $\pm$ 1.46 | 0.59    | 14.28 $\pm$ 1.55                                        | 15.47 $\pm$ 1.46 | 0.59    | 0.51 $\pm$ 0.07                    | 0.38 $\pm$ 0.06              | 0.17    |
| <i>Gluteus medius</i>       | 0.60 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>          | 0.37 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup> | 0.02    | 2.85 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>      | 2.13 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup> | 0.08    | 89.04 $\pm$ 2.53                                    | 89.58 $\pm$ 2.39 | 0.86    | 10.95 $\pm$ 2.53                                        | 10.42 $\pm$ 2.39 | 0.86    | 1.09 $\pm$ 0.15                    | 1.13 $\pm$ 0.14              | 0.85    |
| <i>Gluteobiceps</i>         | 0.28 $\pm$ 0.03                       | 0.29 $\pm$ 0.03              | 0.78    | 1.61 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>      | 0.50 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup> | < 0.001 | 90.79 $\pm$ 0.77                                    | 91.24 $\pm$ 0.72 | 0.71    | 9.21 $\pm$ 0.77                                         | 8.76 $\pm$ 0.72  | 0.71    | 1.15 $\pm$ 0.22                    | 0.83 $\pm$ 0.21              | 0.24    |
| <i>Semimembranosus</i>      | 0.35 $\pm$ 0.05                       | 0.35 $\pm$ 0.04              | 0.99    | 2.66 $\pm$ 0.18                   | 3.00 $\pm$ 0.17              | 0.27    | 71.77 $\pm$ 2.38                                    | 75.25 $\pm$ 2.30 | 0.22    | 28.23 $\pm$ 2.38                                        | 24.75 $\pm$ 2.30 | 0.22    | 1.15 $\pm$ 0.23                    | 1.20 $\pm$ 0.22              | 0.87    |
| <i>Semitendinosus</i>       | 0.33 $\pm$ 0.02                       | 0.33 $\pm$ 0.02              | 0.94    | 3.62 $\pm$ 0.27                   | 3.65 $\pm$ 0.26              | 0.92    | 88.65 $\pm$ 1.78                                    | 87.32 $\pm$ 1.68 | 0.53    | 11.35 $\pm$ 1.77                                        | 12.68 $\pm$ 1.68 | 0.53    | 2.38 $\pm$ 0.29                    | 2.46 $\pm$ 0.22              | 0.85    |

Within the same muscle and trait, those means followed by different superscripts were (a vs. b;  $P < 0.05$ ) or tended to be different (x vs. y;  $P < 0.1$ ).

As a matter of fact, according to Comai and Tajbakhsh (2014), Pax 7 expression is restricted not only to developing skeletal muscle but also to the neural crest and central nervous system.

#### 4.3. Muscle-dependent maternal undernutrition effects on myogenesis

Although previous studies suggest the existence of muscle-dependent effects of maternal undernutrition on muscle development (Ward and Stickland, 1991; Sen et al., 2016; Paradis et al., 2017), much of the research regarding fetal programming effects on sheep myogenesis has been limited to a reduced number of muscles (Zhu et al., 2004; Quigley et al., 2005; Yates et al., 2014; Reed et al., 2014; Sen et al., 2016; Quigley et al., 2015). In the present study, which covers a wider array of muscles, intermuscular differences were found regarding maternal undernutrition effects over fetal muscle development. Intermuscular differences in treatment responses might be associated with the relative proportions of primary and secondary fibers that constitute each muscle, which are actually associated with future adult muscle fiber type characteristics. According to Ward and Stickland (1991), maternal undernutrition affects early myogenesis depending on the relative proportions of primary and secondary fibers that constitute each muscle. Adult slow-oxidative muscles, which exhibit higher proportions of primary fibers during early myogenesis, are less susceptible to prenatal undernutrition (Ward and Stickland, 1991). This might contribute to explain the intermuscular differences in treatment responses found in the present study. As a matter of fact, several intermuscular differences in adult muscle fiber types have been previously reported among the same muscles included in the present study (Ithurralde et al., 2015). Furthermore, intermuscular differences regarding treatment effects could also be associated with the myogenesis phase that each muscle was going through by the time of sampling. In fact, according to Quigley et al. (2015), genes that regulate sheep muscle development are affected by the stage of development in an anatomical muscle-specific manner. This contributes to explain why in the present study treatment differences in PCNA levels of expression were only detected in those muscles exhibiting lower mitotic rates (*Gluteobiceps*, *Longissimus lumborum* or *Gluteus medius*), while within muscles showing higher amounts of PCNA positive cells (*Psoas major*, *Semimembranosus* or *Semitendinosus*) no treatment effects were detected. In summary, our present work describes muscle-dependent effects of maternal undernutrition during the key stage for sheep secondary myogenesis in several heterogeneous and meat-productive relevant muscles from sheep fetuses. Furthermore, we recently demonstrated that reducing pasture allowance to pregnant ewes reduces the weight of some heavy-lamb carcass muscles while others remain unaffected (Ithurralde et al., 2019). Therefore, our present results might contribute to explain our recently found intermuscular differences in individual muscle weights of male heavy-lambs born to undernourished ewes.

#### 5. Conclusions

In conclusion, a reduced pasture allowance to pregnant ewes from 23 days before conception until day 70 of gestation affected muscle development reducing the ratio of secondary to primary fibers, the number of nuclei per fascicle and the proportion of muscle tissue in the major muscles of 70-day old fetuses. These findings are of paramount relevance and might imply permanent future effects over animal health and meat-producing performance. Moreover, our present results suggest that myoblast mitotic activity might be one of the main mechanisms involved in this secondary myogenesis reduction. Further studies will be needed in order to determine whether this lower mitotic activity of undernourished fetal myoblasts is due to an intrinsic defect (molecular machinery of transcriptional regulation of mitosis) or to a time reduction in the myogenic proliferative phase. Moreover, our results suggest that maternal undernutrition may differentially affect early myogenesis depending on the muscle type. Further studies will also be

needed in order to determine whether these intermuscular differences in treatment responses are due to differences in the timing of development between muscles or to intrinsic intermuscular differences such as the relative proportions of primary and secondary fibers that constitute each muscle.

## Funding

This study was partially supported by research project CSIC-Iniciación/2017 awarded to J. Ithurralde.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgments

The authors acknowledge Ing. Agr. Carlos Mantero, Director of the "Estación Experimental Bernardo Rosengurt" for his support, and Ignacio Sosa for his help with animal management during the experimental work. We also thank Juan Ithurralde for his contribution to improving the English language quality of this manuscript. This study was partially supported by research project CSIC-Iniciación/2017 awarded to J. Ithurralde.

## References

- Abud, M.J., 2015. Efecto de la oferta de forraje de campo natural sobre el desarrollo fetal de corderos con especial énfasis en el desarrollo muscular. Effect of Natural Pasture Allowance on Fetal Development With Special Emphasis in Muscular Development. Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay Master's thesis.
- Allen, R.E., Merkel, R.A., Young, R.B., 1979. Cellular aspect of muscle growth: myogenic cell proliferation I. *J. Anim. Sci.* 49 (1), 115–127.
- Ashmore, C.R., Robinson, D.W., Rattray, P., Doerr, L., 1972. Biphasic development of muscle fibers in the fetal lamb. *Exp. Neurol.* 37 (2), 241–255.
- Barnoy, S., Kosower, N.S., 2007. Calpastatin in rat myoblasts: transient diminution and decreased phosphorylation depend on myogenin-directed myoblast differentiation. *Int. J. Biochem. Cell B.* 39 (1), 253–261.
- Ciemerych, M.A., Archacka, K., Grabowska, I., Przewoźniak, M., 2011. Cell cycle regulation during proliferation and differentiation of mammalian muscle precursor cells. In: Kubiak, J.Z. (Ed.), *Cell Cycle in Development*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 473–527.
- Comai, G., Tajbakhsh, S., 2014. Molecular and cellular regulation of skeletal myogenesis. In: In: Solnica-Krezel, L. (Ed.), *Current Topics in Developmental Biology* Volume 110. Academic Press, pp. 1–73.
- Du, M., Wang, B., Fu, X., Yang, Q., Zhu, M.J., 2015. Fetal programming in meat production. *Meat Sci.* 109, 40–47.
- Dwyer, C.M., Stickland, N.C., Fletcher, J.M., 1994. The influence of maternal nutrition on muscle fiber number development in the porcine fetus and on subsequent postnatal growth. *J. Anim. Sci.* 72 (4), 911–917.
- Fahey, A.J., Brameld, J.M., Parr, T., Buttery, P.J., 2005. The effect of maternal under-nutrition before muscle differentiation on the muscle fiber development of the newborn lamb. *J. Anim. Sci.* 83 (11), 2564–2571.
- Freitas-de-Melo, A., Ungerfeld, R., Hötzel, M.J., Abud, M.J., Alvarez-Oxley, A., Orihuela, A., Pérez-Clariget, R., 2015. Mother–young behaviours at lambing in grazing ewes: effects of lamb sex and food restriction in pregnancy. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 168, 31–36.
- Greenwood, P.L., Slepatis, R.M., Bell, A.W., Hermanson, J.W., 1999. Intrauterine growth retardation is associated with reduced cell cycle activity, but not myofiber number, in ovine fetal muscle. *Reprod. Fert. Develop.* 11 (5), 281–291.
- Haydock, K.P., Shaw, N.H., 1975. The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. *Aust. J. Exp. Agric.* 15 (76), 663–670.
- Ithurralde, J., Bianchi, G., Feed, O., Nan, F., Garibotto, G., Bielli, A., 2015. Histochemical fiber types in 16 heavy-lamb skeletal muscles. *Small Rumin. Res.* 125, 88–92.
- Ithurralde, J., Bianchi, G., Feed, O., Nan, F., Ballesteros, F., Garibotto, G., Bielli, A., 2018. Variation in instrumental meat quality among 15 muscles from 14-month-old sheep and its relationship with fibre typing. *Anim. Prod. Sci.* 58 (7), 1358–1365.
- Ithurralde, J., Pérez-Clariget, R., Corrales, F., Fila, D., López-Pérez, A., Marichal, M., Bielli, A., 2019. Sex-dependent effects of maternal undernutrition on growth performance, carcass characteristics and meat quality of lambs. *Livest. Sci.* 221, 105–114.
- Kitzmann, M., Fernandez, A., 2001. Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (4), 571–579.
- Paradis, F., Wood, K.M., Swanson, K.C., Miller, S.P., McBride, B.W., Fitzsimmons, C., 2017. Maternal nutrient restriction in mid-to-late gestation influences fetal mRNA expression in muscle tissues in beef cattle. *BMC Genomics* 18 (1), 632.
- Picard, B., Lefaucheur, L., Berri, C., Duclos, M.J., 2002. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reprod. Nutr. Dev.* 42 (5), 415–431.
- Purslow, P.P., 2005. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. *Meat Sci.* 70 (3), 435–447.
- Quigley, S.P., Kleemann, D.O., Kakar, M.A., Owens, J.A., Nattrass, G.S., Maddocks, S., Walker, S.K., 2005. Myogenesis in sheep is altered by maternal feed intake during the peri-conception period. *Anim. Reprod. Sci.* 87 (3–4), 241–251.
- Quigley, S.P., Greenwood, P.L., Kleemann, D.O., Owens, J.A., Bawden, C.S., Nattrass, G.S., 2015. Myogenesis in small and large ovine fetuses at three stages of pregnancy. *Anim. Prod. Sci.* 55 (2), 207–212.
- Raja, J.S., Hoffman, M.L., Govoni, K.E., Zinn, S.A., Reed, S.A., 2016. Restricted maternal nutrition alters myogenic regulatory factor expression in satellite cells of ovine offspring. *Animal* 10 (7), 1200–1203.
- Reed, S.A., Raja, J.S., Hoffman, M.L., Zinn, S.A., Govoni, K.E., 2014. Poor maternal nutrition inhibits muscle development in ovine offspring. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 5 (1), 43.
- Sen, U., Sirin, E., Yildiz, S., Aksoy, Y., Ulutas, Z., Kuran, M., 2016. The effect of maternal nutrition level during the periconception period on fetal muscle development and plasma hormone concentrations in sheep. *Animal* 10 (10), 1689–1696.
- Soto, S.M., Blake, A.C., Wesolowski, S.R., Rozance, P.J., Barthels, K.B., Gao, B., Hetrick, B., McCurdy, C.E., Garza, N.G., Hay, W.W., Leinwand, L.A., Friedman, J.E., Brown, L.D., 2017. Myoblast replication is reduced in the IUGR fetus despite maintained proliferative capacity in vitro. *J. Endocrinol.* 232 (3), 475.
- Tilley, R.E., McNeil, C.J., Ashworth, C.J., Page, K.R., McArdle, H.J., 2007. Altered muscle development and expression of the insulin-like growth factor system in growth retarded fetal pigs. *Domest. Anim. Endocrinol.* 32 (3), 167–177.
- Van Soest, P.V., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74 (10), 3583–3597.
- Ward, S.S., Stickland, N.C., 1991. Why are slow and fast muscles differentially affected during prenatal undernutrition? *Muscle Nerve* 14 (3), 259–267.
- Wilson, S.J., McEwan, J.C., Sheard, P.W., Harris, A.J., 1992. Early stages of myogenesis in a large mammal: formation of successive generations of myotubes in sheep tibialis cranialis muscle. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 13 (5), 534–550.
- Woo, M., Isganaitis, E., Cerletti, M., Fitzpatrick, C., Wagers, A.J., Jimenez-Chillaron, J., Patti, M.E., 2011. Early life nutrition modulates muscle stem cell number: implications for muscle mass and repair. *Stem Cells Dev.* 20 (10), 1763–1769.
- Yates, D.T., Clarke, D.S., Macko, A.R., Anderson, M.J., Shelton, L.A., Nearing, M., Allen, R.E., Rhoads, R.P., Limesand, S.W., 2014. Myoblasts from intrauterine growth-restricted sheep fetuses exhibit intrinsic deficiencies in proliferation that contribute to smaller semitendinosus myofibers. *J. Physiol. (Paris)* 592 (14), 3113–3125.
- Zammit, P.S., Relais, F., Nagata, Y., Ruiz, A.P., Collins, C.A., Partridge, T.A., Beauchamp, J.R., 2006. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J. Cell. Sci.* 119 (9), 1824–1832.
- Zhu, M.J., Ford, S.P., Nathanielsz, P.W., Du, M., 2004. Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biol. Reprod.* 71 (6), 1968–1973.
- Zou, T., He, D., Yu, B., Yu, J., Mao, X., Zheng, P., He, J., Huang, Z., Shu, Y., Liu, Y., Chen, D., 2016. Moderately increased maternal dietary energy intake delays foetal skeletal muscle differentiation and maturity in pigs. *Eur. J. Nutr.* 55 (4), 1777–1787.
- Zou, T., He, D., Yu, B., Yu, J., Mao, X., Zheng, P., He, J., Huang, Z., Chen, D., 2017. Moderate maternal energy restriction during gestation in pigs attenuates fetal skeletal muscle development through changing myogenic gene expression and myofiber characteristics. *Reprod. Sci.* 24 (1), 156–167.

### **3. EFECTO DE UNA MENOR OFERTA DE FORRAJE DE CAMPO NATURAL DURANTE LA GESTACIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS MUSCULARES EN CORDEROS NEONATOS**

MATERNAL UNDERNUTRITION INDUCED BY A LOWER NATURAL PASTURE ALLOWANCE AFFECTS MUSCLE CHARACTERISTICS IN NEWBORN LAMBS. 2022. Javier Ithurrealde, Raquel Pérez-Clariget, María José Abud, Andrea Álvarez Oxiley, Alberto Casal, Ana Laura Astessiano y Alejandro Bielli. Este artículo ha sido enviado para su publicación a una revista arbitrada internacional.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de una subnutrición inducida con una menor oferta de forraje de campo natural desde antes de la concepción hasta el día 122 de gestación sobre las características histológicas y moleculares, así como la expresión de genes vinculados al desarrollo y a la fisiología muscular en corderos recién nacidos. El trabajo está enmarcado en lo que fue el experimento número 1 de la tesis, cuya etapa de campo se realizó en la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República (Udelar), Uruguay (32° S, 54° W) entre marzo y septiembre de 2013. Brevemente, el experimento consistió en someter a dos grupos de ovejas ( $n = 18$  para cada grupo) a dos ofertas de forraje de campo natural contrastantes (alta oferta = 10 a 12 kg MS/100 kg de PC por día y baja oferta = 5 a 8 kg MS/100 kg de PC por día) desde 23 días previos a la concepción hasta el día 122 de gestación. Al día 122 las ovejas se esquilieron, pasaron a pastorear una pradera de *Festuca arundinacea* (14 kg MS/100kg PC por día) y se suplementaron con glicerina cruda y afrechillo de arroz. Los corderos se sacrificaron al nacer utilizando tiopental endovenoso y se les tomó muestras de los músculos *semitendinosus* y *longissimus lumborum*. Los resultados obtenidos demostraron que una subnutrición inducida por una menor oferta de forraje de campo natural produjo un marcado efecto negativo sobre la histología muscular, reduciendo la densidad fibrilar, el diámetro fibrilar, así como la cantidad de núcleos por fibra y la proporción de tejido muscular. Los hallazgos histológicos se acompañaron, a su vez, de cambios moleculares importantes. Los músculos de los animales hijos de ovejas subnutridas presentaron menor contenido de ADN y una

mayor relación proteína-ADN. A su vez, los resultados indican que la subnutrición intrauterina es capaz de afectar las propiedades contráctiles fibrilares, favoreciendo la expresión de mayores niveles de MyHC lento y también las propiedades biológicas fibrilares aumentando la expresión de GLUT-4. Por otra parte, a pesar de que los resultados sugieren que los músculos de los animales subnutridos podrían presentar algún tipo de estrategia compensatoria dada, por ejemplo, por una mayor cantidad de células satélite indiferenciadas y una mayor capacidad de captación de glucosa, el ambiente endócrino local y, principalmente, los bajos niveles de IGF-1 en los músculos de los animales subnutridos podrían representar una importante limitación para dicha compensación. En síntesis, los resultados del trabajo indican que una subnutrición inducida por una menor oferta de campo natural hasta el día 122 de gestación afecta de forma importante las características musculares del recién nacido pudiendo limitar fuertemente el futuro productivo de estos animales.

## Maternal undernutrition induced by a lower natural pasture allowance affects muscle characteristics in newborn lambs

J. Ithurrealde<sup>a</sup>, R. Pérez-Clariget<sup>a</sup>, M.J. Abud<sup>a</sup>, A. Álvarez-Oxiley<sup>a</sup>, A. Casal<sup>a</sup>, A.L. Astessiano<sup>a</sup>, A. Bielli<sup>b</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Garzón 780, 12900, Montevideo, Uruguay.

<sup>b</sup>Departamento de Morfología y Desarrollo, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, A. Lasplacas 1550, 11600, Montevideo, Uruguay.

### Abstract

We evaluated maternal undernutrition effects induced by a lower natural pasture allowance (days -23 to 123 of gestation) on newborn lambs muscle characteristics. Multiparous ewes were assigned to two nutritional treatments: High-pasture-allowance (HPA) ewes grazed on natural grasslands at 10-12 kg of dry matter (DM)/100 kg of BW/day; and Low-pasture-allowance (LPA) ewes grazed on 5-8 kg of DM/100 kg of BW/day. Samples (*Semitendinosus* and *Longissimus lumborum*) were collected from eighteen (9/treatment) male newborn lambs. HPA treatment increased fiber diameter, nuclei number/fiber and muscle tissue proportion in both muscles ( $P < 0.03$ ). Maternal undernutrition reduced ( $P = 0.005$ ) fiber density in the *Longissimus*. HPA treatment increased DNA concentration and reduced protein/DNA ratio in both muscles ( $P \leq 0.04$ ). HPA treatment increased ( $P = 0.01$ ) protein concentration in the *Semitendinosus*. The *Longissimus* from LPA lambs tended to show higher mRNA expressions of *MyHC-I*, *GLUT-4* and *PAX7* ( $P \leq 0.0663$ ). *PAX7* expression was higher in the *Semitendinosus* of LPA lambs ( $P = 0.03$ ). *IGF-I* expression was higher in both HPA muscles ( $P \leq 0.05$ ). Our results demonstrate that a reduced gestational pasture allowance induces several negative effects that might seriously limit postnatal muscle growth. Although LPA muscles showed some insights which could indicate an attempt to compensate for the negative effects (greater *GLUT-4* and *PAX7* expressions), the local endocrine environment (reduced *IGF-I* expression) could be a major limiting factor for such compensation. Thus, a lower maternal pasture allowance affects newborn lambs muscle characteristics with possible future effects over animal health and meat-producing performance.

**Keywords:** Fetal programming, sheep, mRNA, myogenesis.

### 1. Introduction

Skeletal muscle is a key organ for animal production since it is the main component of meat pieces. Moreover, skeletal muscle plays an important metabolic role for animal health and production performance since it is responsible for approximately 80 % of glucose disposal under

insulin-stimulated conditions (dos Santos et al., 2015). Given that skeletal muscle fibers are formed during early stages of intrauterine development (Picard et al., 2002) and that muscle tissue has a low nutrient partitioning priority (Abud et al., 2020; Close and Pettigrew, 1990), it is likely that prenatal insults would affect muscle characteristics thus

compromising animal health and production performance.

In sheep, as in most livestock species, skeletal muscle development can be divided into two distinct phases: an initial proliferative phase which occurs very early during fetal development and a later hypertrophic growth phase (Picard et al., 2002). Generally, it is established that prenatal insults, such as maternal undernutrition which occur during early gestation, affect the proliferating phase of myogenesis and result in muscles reduced in number of muscle fibers (Dwyer et al., 1994; Zhu et al., 2004). Nevertheless, some postnatal mechanisms could compensate the reduction in muscle cell number with increased hypertrophic capacity. One of the main mechanisms involved in postnatal muscle growth is satellite cell-mediated muscle hypertrophy (Pallafacchina et al., 2013). Furthermore, prenatal under nutrition may also impact fiber differentiation affecting several biological properties of muscle fibers such as contractile characteristics and glucose uptake ability (Lefaucheur and Gerrard, 2000; Lefaucheur, 2010). Some very important biological characteristics of skeletal muscles can be related to changes in the level of mRNA expression of specific genes. Paired box protein 7 (*PAX 7*) is an indicator of satellite cells which can be related to postnatal hypertrophic ability (Scharner and Zammit, 2011). The slow isoform of myosin heavy chain (*MyHC-I*) indicates

the contractile profile of muscle fibers (Lefaucheur, 2010). Glucose transporter type 4 (*GLUT-4*) is related to glucose uptake ability which can be also related to postnatal growth (Costello et al., 2008). Myogenin is a specific myogenic regulatory factor which allows the identification of fusing (differentiating) satellite cells (Wang and Rudnicki, 2012). Insulin-like growth factor 1 (*IGF-1*) is one of the main local endocrine regulators of postnatal muscle growth (Clemmons, 2009), while peroxisome proliferator activated-receptor- $\gamma$  (*PPARG*) is an important regulator of lipid metabolism (Madsen et al., 2014).

We have recently demonstrated that a lower natural pasture allowance offered to pregnant ewes from 23 days before conception reduces the number of secondary fibers in muscles from 70-day old fetuses (Ithurrealde et al., 2020). However, in some extensive livestock systems maternal undernourishment could continue into later stages of gestation. Thus, the present study was designed to evaluate whether maternal undernourishment until 123 days of gestation could imply changes in muscle characteristics in newborn lambs.

We hypothesized that a low pasture allowance of natural grasslands from 23 days before conception to 123 days of gestation affects histological and molecular characteristics as well as specific gene expressions related to muscle and lipid metabolism (*PPARG*, *MyHC-I* and *GLUT-4*) and

hypertrophic ability (*PAX 7*, *MYOGENIN*, and *IGF-I*) in muscles from newborn lambs.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals, treatments and experimental design

The experiment was conducted at Estación Experimental Bernardo Rosengurtt (Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay, 32° S, 54° W). All animal procedures were approved by the Animal Experimental Committee of the UdelaR (Comité de ética en el uso de animales; Res. 477). The experimental design was previously reported (Freitas de Melo et al., 2015; Abud et al., 2020). Briefly, 36 multiparous Corriedale ewes with an initial live weight (LW) and body condition score (BCS, scale 1 = emaciated – 5 = obese; Jefferies, 1961) of  $48.9 \pm 0.3$  kg and  $2.74 \pm 0.02$ , respectively, were used in a complete randomized block design. Twenty three days before artificial insemination (AI), ewes were randomly assigned to two nutritional treatments which consisted of high (HPA, n=18) and low (LPA, n=18) native pasture allowances. HPA ewes grazed on natural grasslands at 10 (March-June) - 12 (July) kg dry matter (DM) /100 kg of LW/day, while LPA ewes grazed on the same three blocks of natural grasslands but at 5 (March- June) - 8 (July) kg DM /100 kg of LW/day. Pasture allowances were adjusted monthly using pasture mass measurements (Haydock and Shaw,

1975) and including or removing ewes according to the “put-and-take” method. Pasture chemical composition (ashes, crude protein, neutral and acid detergent fiber) and pasture intake were calculated according to Van Soest et al. (1991) and were previously reported (Abud et al., 2020). Furthermore, the energy and protein balance were estimated considering the energy and protein requirements obtained from the 2007 and 1985 NRC tables, and were previously reported (Abud et al., 2020). Estimated energy balance in the HPA ewes was 136, 126, 102 and 108 %, on days -23 to 24, 25–58, 59–96 and 97-122 of gestation, respectively. LPA ewes had an estimated energy balance of 106, 83, 74 and 84 % on the said gestation days, respectively. Estimated protein balance was 108, 99, 83 and 69 % for HPA ewes on days -23 to 24, 25–58, 59–96 and 97-122 of gestation, respectively, and 102, 70, 67 and 50 % for LPA ewes on the said gestation days, respectively (Abud et al., 2020). Ewes were estrus synchronized and pericervically inseminated with fresh semen from three Corriedale rams 12 h after estrus detection (day 0). On day 70, 18 ewes (nine/treatment, three/plot) carrying single male fetuses were euthanized and used for previously reported determinations (Abud et al., 2020; Ithurralde et al., 2020).

The remaining 18 dams (nine HPA and nine LPA ewes carrying single male fetuses) continued in the same treatments until shearing on gestation day

122. After shearing, all ewes grazed as a single mob on *Festuca arundinacea* at 2.8 kg DM/kg LW until lambing. From 5 days before shearing until lambing, all 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 *ad libitum* on natural grasslands in small paddocks, where they continued to be supplemented, and continuously monitored until lambing (Freitas-de-Melo et al., 2015). Lambs were euthanized using i.v. tiopental (Novartis, Uruguay), 12 h after birth.

## **2.2. Records, sampling and measurements in the ewes**

Live weights and BCS of the ewes were recorded at -23, 0, 24, 58, 96, 122, and 145 days of gestation and were previously reported (Abud et al., 2020). HPA ewes were heavier and showed higher BCS than LPA ewes (HPA:  $47.3 \pm 0.3$  kg and  $2.70 \pm 0.02$  versus LPA:  $45.2 \pm 0.3$  kg,  $2.53 \pm 0.02$ , BW and BCS, respectively;  $P < 0.0001$ ; Abud et al., 2020).

Blood samples (8 mL) were taken from all the ewes by venipuncture of the jugular vein using heparinized tubes on days -23, 122 and 145 of gestation. Blood 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 µIU/mL, the intra assay coefficient of variation for the low control (17.5 µIU/mL) and high control (101.5 µIU/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%.

## **2.3. Records, sampling and measurements in the newborn lambs**

Newborn lamb's live and carcass weights as well as Gootwine growth indexes were recorded and previously reported (Abud et al., 2020). HPA newborn lambs were heavier ( $P = 0.008$ ) and showed heavier carcasses ( $P = 0.0005$ ) than LPA newborn lambs (Abud et al., 2020). Also, the Gootwine Index was higher in HPA than in LPA newborn lambs ( $P = 0.02$ ) (Abud et al., 2020).

Before euthanasia, a blood sample (3 mL) was taken from all newborn lambs by venipuncture of the jugular vein using heparinized tubes. Plasma non-esterified fatty acids (NEFA), glucose, albumin, urea, cholesterol, and total protein concentrations were determined spectrophotometrically using

commercial kits (Wako NEFA, Wako Chemical, Richmond, USA, glucose oxidase/peroxidase, albumin Bromocresol Green, urea Ureasa/Salicilato, cholesterol oxidase/peroxidase, 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.

Immediately after euthanasia, samples were taken from the mid superficial belly of the *Longissimus lumborum* and the *Semitendinosus* muscles of newborn lambs. One sample was fixed in 4% buffered formaldehyde and used for histological determinations, and another sample was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until molecular determinations.

#### **2.4. Histological examinations in neonatal muscles**

Samples were embedded in paraffin wax through standard histological techniques and 6 µm thick sections were obtained from the center of each sample (microtome model 2030 Reichert-Jung, MIN, USA). Samples (1 sample/muscle/animal)

from neonatal muscles were stained with hematoxylin-eosin to evaluate muscle morphology. Fiber density and the proportion of muscle and non-muscle tissues were estimated from 5 microscope fields/muscle/animal. Fiber diameter was calculated as the mean from 30 transversal fiber sections. The number of nuclei/fiber was calculated as the mean from all transversal fiber sections in 5 microscope fields/muscle/animal. All histological variables were measured using an image analysis system (400x, light microscope Olympus BX50, videocamera, software Infinity analyze®, Toronto, Canada).

#### **2.5. 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 Technologies, 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.

## 2.6. Quantitative real time PCR

Isolated RNA was stored at -80° C until analyzed by quantitative real time PCR. Reverse Transcription was conducted with Super- Scripts III Transcriptase (Invitrogen) using random hexamers and 1 µg of total RNA as a template. The cDNA was stored at -20°C until use in the quantitative real time PCR. Primers (Table 1) specifically designed to amplify cDNA for the target genes of interest: *IGF1*, *PPARG*, *PAX7*, *MyHC-I*, *GLUT-4* and *MYOGENIN*, and endogenous control genes:  $\beta$ -actin (*ACTB*) hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT*) were used for real time RT-PCR. Before use, primer product size (1% agarose gel separation) and sequence (Macrogen Inc., Seoul, Korea) were determined to ensure that the primers produced the desired amplification products (data not shown).

Real time PCR reactions were performed in a total volume of 15 µl using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (ThermoFisher Scientific), using the following standard amplification conditions: 10 min at 95°C and 40 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 60°C, and 30s at 72°C in a 48-well StepOne™ Real-Time PCR System

(Applied Biosystems™ from ThermoFisher Scientific). Dissociation curves were run on all samples to detect primer dimers, contamination, or presence of other amplicons. Each plate was designed including a pool of total RNA from muscle samples analyzed in triplicate to be used as the basis for the comparative expression results (exogenous control) and duplicate wells of water (non-template control). Gene expression was measured by relative quantification to the exogenous control (Pfaffl, 2009) and normalized to the mean expression of the endogenous control genes (*ACTB* and *HPRT*) corrected by amplification efficiency. Both *ACTB* and *HPRT* have been used before as an endogenous control in skeletal muscle (Feng et al., 2010) and did not vary among samples in this study. Amplification efficiency for target and endogenous control genes was estimated by linear regression of a dilution cDNA curve ( $n/45$  dilutions, from 100 to 6.25ng/well; Table1). The intra and inter-assays CV were lower than 7.6 and 12.3%,

## 2.7. 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 pasture allowance) in three blocks and six plots (3 plots by treatment). Data of plasma hormone

concentrations of the ewes were analyzed as repeated measures using the MIXED procedure (PROC MIXED) with day of gestation as the repeated effect. The model included the nutritional treatment, day of gestation and their interactions as fixed effects and the block as the random effect. Initial values (day -23) were used as covariate in their respective data analysis models. All the variables measured in the newborn lambs were analyzed using a mixed model (PROC MIXED). The adjusted models included pasture allowance (HPA vs. LPA) as fixed effect and the block as the random effect. The interaction between pasture allowance and block was included in the model as a random effect but when the covariance parameter estimate was zero it was removed from the model. Concentration of metabolites and hormones in newborn lambs were also analyzed using the birth weight as covariate to study if the changes were a reflection of the birth weight. In the Results section 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. Data are expressed as least square means  $\pm$  standard errors of the mean. 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. Results

#### 3.1. Plasma concentration of hormones in ewes

Pasture allowance affected the plasma concentration of insulin (HPA:  $12.78 \pm 1.00$   $\mu$ IU/mL vs LPA:  $8.61 \pm 1.44$   $\mu$ IU/mL;  $P = 0.05$ ) and IGF-I (HPA:  $253.01 \pm 20.78$  ng/mL vs LPA:  $161.42 \pm 24.98$  ng/mL,  $P = 0.04$ ) in the pregnant ewes. The plasma concentration of both hormones was also affected by the day of gestation ( $P < 0.001$ ). The interaction between pasture allowance and day of gestation affected ( $P = 0.05$ ) the concentration of insulin, and tended ( $P = 0.1$ ) to influence the concentration of IGF-I. Ewes of the HPA group showed greater ( $P < 0.05$ ) concentration of insulin at day 122 ( $11.67 \pm 1.35$   $\mu$ IU/mL) and 145 ( $19.33 \pm 1.31$   $\mu$ IU/mL) of gestation than those of LPA group (day 122:  $6.68 \pm 1.85$   $\mu$ IU/mL and day 145:  $12.08 \pm 1.85$   $\mu$ IU/mL). Furthermore, at day 145 of gestation plasma concentration of IGF-I was greater ( $P < 0.05$ ) in HPA ( $370.23 \pm 33.81$  ng/mL) than in LPA ewes ( $198.91 \pm 40.19$  ng/mL). In both groups, the plasma concentration of insulin and IGF-I increased ( $P < 0.05$ ) during the period in which ewes grazed on the *Festuca* prairie.

#### 3.2. Plasma concentrations of hormones and metabolites in newborn lambs

Despite the arithmetic differences observed in plasma concentrations of glucose, albumin and insulin between HPA and LPA lambs (Table 2), such differences did not reach the level of

significance. Pasture allowance did not affect the metabolite or hormone concentrations (Table 2). When birth weight was included in the model as a covariate, metabolite and hormone concentrations were not different either ( $P \geq 0.12$ ).

### 3.3. Histological and molecular (RNA, DNA and Protein concentration) variables in muscles from newborn lambs

Pasture allowance affected mean fiber diameter, nuclei number/fiber and proportion of muscle tissue in both the *Longissimus lumborum* and *Semitendinosus* muscle of newborn lambs (Table 3;  $P < 0.03$ ). Lambs born to HPA ewes showed greater values than LPA lambs. On the other hand, non-muscle tissue was greater ( $P < 0.03$ ) in LPA than in HPA newborn lambs. Pasture allowance also affected ( $P = 0.005$ ) fiber density of the *Longissimus lumborum* muscle while a trend was found in the *Semitendinosus* muscle ( $P = 0.09$ , Table 3).

Pasture allowance did not affect RNA concentration or PR/RNA ratio ( $P > 0.58$ ) in none of the studied muscles. Protein concentration of *Longissimus lumborum* was not affected ( $P = 0.53$ ) by pasture allowance. However, the protein concentration of the *Semitendinosus* muscle was greater ( $P = 0.01$ ) in HPA newborn lambs. On the other hand, pasture allowance affected ( $P < 0.04$ ) DNA concentration and PR/DNA ratio in both muscles. Newborn HPA lambs showed greater DNA

concentration and lower PR/DNA ratio in both muscles (Table 3).

### 3.4. Muscle gene expression in newborn lambs

In the *Longissimus lumborum* muscle the LPA treatment tended to increase the mRNA expression of *MYHC-I* ( $P = 0.05$ ), *GLUT-4* ( $P = 0.06$ ) and *PAX 7* ( $P = 0.07$ ) (Table 4). Also, muscle expression of *IGF1* mRNA was higher in the *Longissimus lumborum* of HPA lambs ( $P = 0.04$ ) (Table 3). In the *Semitendinosus* muscle the LPA treatment increased the expression of *PAX7* mRNA ( $P = 0.03$ ) while it reduced the expression of *IGF1* mRNA ( $P = 0.05$ ) (Table 4).

## 4. Discussion

Our present study demonstrates that a lower natural pasture allowance offered to pregnant ewes from before conception until late gestation (23 days before lambing) affects muscle characteristics in newborn lambs, resulting in muscles showing less and smaller fibers, with less nuclei, reduced DNA content and lower PR/DNA ratio. Furthermore, our results also indicate that a lower natural pasture allowance during gestation may affect the contractile and biological properties of muscle fibers with higher expression of slow types of MyHC and GLUT-4. Although most of the aforementioned effects could imply severe impacts on future animal performance and health, the results of the present

study may also suggest that muscles from *in utero* undernourished lambs could show a compensatory mechanism based on a greater number of satellite cells and a higher glucose uptake ability through GLUT-4.

Our finding of a clear negative effect of maternal undernutrition on muscle development was expectable since we had recently reported that a reduced pasture allowance offered to pregnant ewes from 23 days before conception until day 70 of gestation reduces the number of secondary fibers and the expression of PCNA in fetal muscles (Ithurrealde et al., 2020). Therefore, results of the present study confirm that when undernourishment under extensive grazing conditions extends until 20 days before lambing, the observed negative effects on muscle fetal development deepen and become evident through very negative effects on the muscular characteristics of newborns. In the present study LPA ewes suffered undernourishment which became evident through their lower body weight, lower body condition score (Abud et al., 2020) and their worse energy balance as suggested by the lower plasma concentration of insulin and IGF-I. This poorer nutritional status resulted in the negative effects observed in muscle characteristics which affected both the hyperplasic and hypertrophic phase of myogenesis. Our results regarding the effects of maternal undernutrition on muscle development are consistent with Fahey et al. (2005) who reported that

lambs born to ewes restricted between days 85 and 115 show reduced individual muscle weights. Furthermore, our results are also generally consistent with Greenwood et al. (2000) who reported that low birth weight newborn lambs had smaller *Semitendinosus* muscles that contained less DNA, RNA, and protein. Also, our present results are consistent with Yates et al. (2014) who reported that the mean cross-sectional myofiber area was 36% less in the *Semitendinosus* from IUGR near-term fetuses. Our finding of a reduced fiber density in muscles from LPA newborn lambs is probably due to a depletion in the proliferative phase of myogenesis which resulted in a reduced number of muscle fibers in undernourished lambs. As a matter of fact, as we mentioned before, the same nutritional treatments induced a reduction in both the mitotic activity and the number of secondary fibers in muscles from 70 day old LPA fetuses (Ithurrealde et al., 2020). According to Picard et al. (2002) secondary fetal fibers are the main contributors to adult muscle mass and therefore, a reduction in their number during early myogenesis may explain the reduced fiber density found in LPA newborn lambs. Additionally, the reduced fiber density in LPA lambs can also be due to the smaller fibrillar size detected in LPA muscles. In our present study, the extension of maternal undernutrition until day 123 of gestation reduced the hypertrophic capacity of both muscles, thus resulting in a reduction in the

mean diameter of muscle fibers in newborn lambs. This is consistent with Yates et al. (2014) who reported that intrauterine growth restriction from 40 to 95 days of gestation reduced the size of muscle fibers in the *Semitendinosus* of 135-day old sheep fetuses. Even more, our present results are also consistent with Daniel et al. (2007) who reported that maternal undernutrition until day 85 of gestation reduced the mean diameter of muscle fibers in the *Longissimus dorsi* of 17-week old lambs. Furthermore, our finding of a reduced fiber diameter in muscles from lambs born to undernourished ewes might be associated not only with impairment of hypertrophic processes, but also with differences in fetal fiber differentiation. It is generally accepted that primary myotubes mostly mature to slow-oxidative fibers, while secondary fibers mostly mature to fast-glycolytic fibers (Picard et al., 2002). Moreover, mature fast-glycolytic fibers are generally larger than slow-oxidative fibers in most predominantly fast-glycolytic or intermediate sheep muscles (Ithurralde et al., 2015) due to their higher ability to experience postnatal hypertrophy (Lefaucheur, 2010). Therefore, in our present work, early myogenesis impairment might redound in a reduction in the number of mature fast-glycolytic fibers, thus resulting in a reduction in the global mean diameter of fibers comprising muscles. As a matter of fact, this concept is consistent with our

finding of higher expression of MyHC type I in the *Longissimus lumborum* of LPA lambs.

Another possible explanation to the reduced fiber density found in muscles from LPA lambs in the present study might be related to the competitive relationship that exists between myogenesis, adipogenesis and fibrogenesis during development (Du et al., 2015). This theory is consistent with our finding of a greater proportion of non-muscle tissues in both muscles from LPA lambs. Therefore, in the present study, in order to determine if adipogenesis could be affected by maternal undernutrition, we evaluated the expression of one of the main transcriptional factors that regulates late adipogenesis: PPAR $\gamma$  which enhances the expression of genes responsible in adipocyte gene program (Madsen et al., 2014). Interestingly, we found no effect of maternal undernutrition on the expression of PPAR $\gamma$  in newborn muscles. This is consistent with Costa et al. (2021) who recently reported that maternal protein restriction during mid-gestation does not affect the expression of the late adipogenic markers CEBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$  in muscles from 30 day old calves. Therefore, our results suggest that the increased proportion of non-muscle tissues might not be associated with enhanced adipogenesis but perhaps, simply to reduced myogenesis. This could also imply that the increase in non-muscular tissues would be due to an increased fibrogenesis since both ontogenic

processes (adipogenesis and fibrogenesis) are highly associated (Du et al., 2015).

On the other hand, as mentioned above, in the present study we found a strong trend for an increase in the level of expression of MyHC type I in the *Longissimus* muscle from LPA newborn lambs which suggests that maternal undernutrition affects the contractile properties of muscle fibers. This finding is consistent with Fahey et al. (2005) who reported that undernutrition of pregnant ewes between days 30 and 70 of gestation increased the expression of MyHC type I and the proportion of slow fibers in muscles from 14 day old lambs. Similarly, Bauer et al (2006) demonstrated that muscles from IUGR newborn piglets show increased proportion of type I fibers and capillary density. As mentioned above, this findings could be related to a reduction in secondary myogenesis induced by maternal undernutrition since most secondary fetal fibers differentiate to mature fast and glycolytic fibers (Picard et al., 2002). Moreover, the greater expression of MyHC-I in LPA lambs is also consistent with our finding of a strong trend for a greater expression of GLUT-4 in the same muscle from LPA lambs, since both glucose uptake and GLUT-4 levels are known to be greater in muscles containing more slow-oxidative fibers (Kern et al 1990).

In the present study we also detected some important effects that might imply a reduction in

later postnatal muscle hypertrophic ability, such as a reduction in the mean number of nuclei per muscle fiber. This finding is consistent with Greenwood et al. (2000) who reported that low birth weight lambs show reduced muscle DNA content and could imply an important negative effect on postnatal muscle growth. As a matter of fact, according to Beermann (1983) the number of nuclei in a muscle is more important for growth potential than its fiber number. The reduced number of nuclei found in both muscles from LPA lambs may be due to a reduction in the number of myoblasts originally fused to form fetal fibers. Fetal primary and secondary fibers are issued from myoblasts which proliferate and fuse (Picard et al., 2002). Therefore, each nucleus constituting a muscle fiber comes from a fused and differentiated myoblast. Also, the reduced total protein concentration found in the *Semitendinosus* muscle of LPA newborn lambs might be explained through the presence of a reduced number of muscle fibers, and by their reduced mean diameter, which implies the presence of less intramuscular myofibrillar proteins, thus resulting in a reduction of total protein concentration. The protein/DNA ratio (DNA unit, Cheek, 1985), an indicator of growth and muscle volume, was higher in both muscles from LPA lambs; these results were in agreement with the lower number of nuclei observed. Therefore, our present results suggest that LPA lambs could show

important limitations for postnatal muscle growth and thus limited future productive performance.

On the other hand, despite the fact that the results of the present study indicate an important compromise for muscle development, we also detected some findings that could indicate partial compensation for the negative effects. Specifically, increased levels of PAX 7 in LPA lambs could indicate an increase in the number of active satellite cells at birth in undernourished lambs. Satellite cells are stem cells with myogenic ability that can be recognized by the expression of PAX 7 and that play a key role in early stages of postnatal muscle development (Scharner and Zammit, 2011). Our finding of a higher expression of PAX 7 in muscles from LPA lambs are generally consistent with previous reports. According to Beerman et al. (1983) both the incidence of satellite cells per muscle fiber in transverse section and satellite cells as a percentage of total nuclei are higher in muscles from 21 day old *in utero* restricted rats. The authors explained these findings as an attempt to compensate for the negative effects induced by maternal undernutrition, stating that the number of satellite cells may have remained high in an attempt to achieve the full complement of nuclei accumulated in muscles from non-restricted animals. Furthermore, according to Costa et al. (2021) the expression of PAX 7 tended to be greater in the progeny from restricted cows. Similarly, we

recently reported that maternal undernutrition tended to increase PAX7 expression in the *Psoas major* of 70 day old sheep fetuses (Ithurralde et al., 2020). As mentioned above, higher PAX 7 expressions in muscles from restricted lambs could imply a compensatory strategy for postnatal muscle development. Nevertheless, satellite cells need a suitable environment for their compensatory role which includes the presence of specific growth factors. One of the main factors involved in satellite cell regulation is IGF-1, which has been shown to stimulate the proliferation, differentiation and fusion of satellite cells with existing myofibers during postnatal growth (Florini et al., 1996; Hawke and Garry, 2001). Furthermore, it has been demonstrated that local production of IGF-1 in skeletal muscles has a greater effect on muscle development as compared with circulating IGF-1 levels (Philippou et al., 2007; Clemmons, 2009). In fact, Adams and Haddad (1996) have reported a positive correlation between muscle IGF-1 expression and the increase in muscle nuclear DNA content in the overloaded muscle. In our present study, IGF-1 levels were very negatively affected in both muscles from LPA lambs. Therefore, our results suggest that despite a possible greater presence of satellite cells at birth, muscles from LPA newborn lambs would not have a favorable local environment for these cells to express their greater compensatory capacity.

On the other hand, in the present study we also evaluated the expression of the myogenic regulatory factor myogenin in order to estimate if maternal undernutrition could affect the number of differentiating satellite cells at birth. According to Wang and Rudnicki, (2012) when satellite cells progress into differentiation they downregulate PAX7 and upregulate myogenin. Our results indicate that myogenin expression is not affected by maternal undernutrition in muscles at birth. This is consistent with Reed et al. (2014) who reported that restricted nutrient consumption during gestation did not alter expression of myogenin in muscles from newborn lambs, and suggests that muscles from LPA lambs at birth would not be showing higher rates of satellite cell differentiation.

Furthermore, as mentioned above the greater expression of GLUT-4 found in the *Longissimus lumborum* from LPA lambs may also be associated with an attempt to compensate for the negative effects induced by maternal undernutrition. These results are consistent with Costello et al. (2008) who stated that the increased mRNA levels of insulin receptor and GLUT-4 found in muscles from late gestation undernourished near-term sheep fetuses could represent a compensatory mechanism to increase skeletal muscle glucose homeostasis in muscles with decreased numbers of myofibres. As a matter of fact, several previous studies carried out in rodents have demonstrated that prenatal

undernutrition can be associated with increased insulin sensitivity and GLUT-4 up-regulation in skeletal muscles (Ozanne et al., 1996; Agote et al., 2001; de Freitas et al., 2003).

## 5. Conclusions

In conclusion, our present results demonstrate that a reduced natural pasture allowance offered to pregnant ewes underfed from before conception until late gestation negatively affects muscle development in newborn lambs. Maternal nutrient restriction affected the contractile and biological properties of muscle fibers as well as diverse aspects that might seriously limit postnatal muscle growth. Although muscles from restricted lambs showed some insights which could indicate an attempt to compensate for the negative effects through a greater glucose uptake and an increased number of active satellite cells, the local endocrine environment (specifically the reduced levels of local IGF-1) could be a major limiting factor for such compensation.

## Acknowledgements

The authors acknowledge Ing. Agr. Carlos Mantero, Director of the “Estación Experimental Bernardo Rosengurt”, and Téc. Pec. Ignacio Sosa, Carlos García, Baltazar Martínez, and Ing. Agr. Xenia Vieira for his help with pasture and animal management. The authors also thank Drs. C. López Mazz and M. Regueiro for ultrasound diagnosis, and Dr. Patricia Genovese, V. Riaño and Dr. Álvaro

López-Pérez for their help during sampling. This study was partially supported by research project CSIC-Iniciacion/2017 awarded to J. Ithurralde.

## References

1. Abud, M. J., Bielli, A., Ithurralde, J., Freitas-de-Melo, A., Álvarez-Oxiley, A., López-Pérez, Á., Ungerfeld, R., Pérez-Clariget, R., 2020. Forage allowances offered to pregnant ewes until middle and late gestation: Organ priorities on foetus development. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 50(3), 471-480.
2. Adams, G. R., Haddad, F., 1996. The relationships among IGF-1, DNA content, and protein accumulation during skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.*, 81(6), 2509-2516.
3. Agote, M., Goya, L., Ramos, S., Alvarez, C., Gavete, M. L., Pascual-Leone, A. M., Escrivá, F., 2001. Glucose uptake and glucose transporter proteins in skeletal muscle from undernourished rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 281(5), E1101-E1109.
4. Bauer, R., Gedrange, T., Bauer, K., Walter, B., 2006. Intrauterine growth restriction induces increased capillary density and accelerated type I fiber maturation in newborn pig skeletal muscles. *J. Perinat. Med.* 34, 235–242.
5. Beermann, D. H., Hood, L. F., Liboff, M., 1983. Satellite cell and myonuclei populations in rat soleus and extensor digitorum longus muscles after maternal nutritional deprivation and realimentation. *J. Anim. Sci.*, 57(6), 1618-1625.
6. Beermann, D. H., 1983. Effects of maternal dietary restriction during gestation and lactation, muscle, sex and age on various indices of skeletal muscle growth in the rat. *J. Anim. Sci.*, 57:328–337.
7. Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
8. Cheek, D. B., 1985. The control of cell mass and replication. The DNA unit – a personal 20-year study. *Early Hum. Dev.*, 12, 211-239.
9. Clemmons, D., 2009. Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol. Metab.*, 20(7): 349-356.
10. Close, W. H., Pettigrew, J. E., 1990. Mathematical models of sow reproduction. *J. Reprod. Fertil.*, 40, 83–88.
11. Costa, T. C., Du, M., Nascimento, K. B., Galvão, M. C., Meneses, J. A. M., Schultz, E. B., Gionbelli, M. P., Duarte, M. D. S.,

2021. Skeletal Muscle Development in Postnatal Beef Cattle Resulting from Maternal Protein Restriction during Mid-Gestation. *Animals*, 11(3), 860.
12. Costello, P. M., Rowleson, A., Astaman, N. A., Anthony, F. E. W., Sayer, A. A., Cooper, C., Hanson, M. A., Green, L. R., 2008. Peri-implantation and late gestation maternal undernutrition differentially affect fetal sheep skeletal muscle development. *J. Physiol.*, 586(9), 2371-2379.
13. Daniel, Z. C. T. R., Brameld, J. M., Craigon, J., Scollan, N. D., Buttery, P. J., 2007. Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on lamb carcass characteristics and muscle fiber composition. *J. Anim. Sci.*, 85(6), 1565-1576.
14. de Freitas, M. S., De Souza, E. P. G., da Silva, S. V., da Rocha Kaezer, A., da Silva Vieira, R., Moura, A. S., Barja-Fidalgo, C., 2003. Up-regulation of phosphatidylinositol 3-kinase and glucose transporter 4 in muscle of rats subjected to maternal undernutrition. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, 1639(1), 8-16.
15. dos Santos, J. M., Moreli, M. L., Tewari, S., Benite-Ribeiro, S. A., 2015. The effect of exercise on skeletal muscle glucose uptake in type 2 diabetes: An epigenetic perspective. *Metabolism*, 64(12), 1619-1628.
16. Du, M., Wang, B., Fu, X., Yang, Q., Zhu, M. J., 2015. Fetal programming in meat production. *Meat Sci.*, 109, 40-47.
17. Dwyer, C. M., Stickland, N. C., Fletcher, J. M., 1994. The influence of maternal nutrition on muscle fiber number development in the porcine fetus and on subsequent postnatal growth. *J. Anim. Sci.*, 72(4), 911-917.
18. Fahey, A. J., Brameld, J. M., Parr, T., Buttery, P. J., 2005. The effect of maternal undernutrition before muscle differentiation on the muscle fiber development of the newborn lamb. *J. Anim. Sci.*, 83(11), 2564-2571.
19. Feng, X., Xiong, Y., Qian, H., Lei, M., Xu, D., Ren, Z., 2010. Selection of reference genes for gene expression studies in porcine skeletal muscle using SYBR green qPCR. *J. Biotechnol.*, 150(3), 288-293.
20. Florini, J. R., Ewton, D. Z., Coolican, S. A., 1996. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr. Rev.* 17, 481-517.
21. Freitas-de-Melo, A., Ungerfeld, R., Hötzel, M. J., Abud, M. J., Alvarez-Oxiley, A.,

- Orihuela, A., Damián, J. P., Pérez-Clariget, R., 2015. Mother–young behaviours at lambing in grazing ewes: Effects of lamb sex and food restriction in pregnancy. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 168, 31-36.
22. Greenwood, P. L., Hunt, A. S., Hermanson, J. W., Bell, A. W., 2000. Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: II. Skeletal muscle growth and development. *J. Anim. Sci.*, 78(1), 50-61.
23. Hawke, T. J., Garry, D. J., 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.*, 91, 534–551.
24. Haydock, K. P., Shaw, N. H., 1975. The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. *Aust. J. Exp. Agric.*, 15(76), 663–670.
25. Ithurralde, J., Bianchi, G., Feed, O., Nan, F., Garibotto, G., Bielli, A., 2015. Histochemical fiber types in 16 heavy-lamb skeletal muscles. *Small Rumin. Res.*, 125, 88-92.
26. Ithurralde, J., Genovese, P., Abud, M. J., López-Pérez, Á., Pérez-Clariget, R., Bielli, A., 2020. Maternal undernutrition affects secondary myogenesis in a muscle-dependent way across the major muscles of 70-day old ovine fetuses. *Small Rumin. Res.*, 191, 106174.
27. Jefferies, B. C., 1961. Body condition scoring and its use in management. *Tasmanian J. Agric.* 32, 19-21.
28. Johnson, M. L., Redmer, D. A., Reynolds, L. P., 1997. Uterine growth, cell proliferation, and c-fos proto-oncogene expression throughout the estrous cycle in ewes. *Biol. Reprod.*, 56 (2), 393-401.
29. Kern, M., Wells, J. A., Stephens, J. M., Elton, C. W., Friedman, J. E., Tapscott, E. B., Pekala, P., H., Dohm, G. L., 1990. Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporter (Glut4) protein level. *Biochem. J.*, 270(2), 397-400.
30. Lefaucheur, L., Gerrard, D., 2000. Muscle fiber plasticity in farm mammals. *J. Anim. Sci.*, 77(1), 19.
31. Lefaucheur, L., 2010. A second look into fibre typing–Relation to meat quality. *Meat sci.*, 84(2), 257-270.
32. Madsen, M. S., Siersbæk, R., Boergesen, M., Nielsen, R., Mandrup, S., 2014. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  synergistically activate key metabolic adipocyte genes by assisted loading. *Mol. Cell. Biol.*, 34(6), 939-954.
33. Ozanne, S. E., Wang, C. L., Coleman, N., Smith, G. D., 1996. Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-

- malnourished rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 271(6), E1128-E1134.
34. Pallafacchina, G., Blaauw, B., Schiaffino, S., 2013. Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 23, S12-S18.
  35. Philippou, A., Maridaki, M., Halapas, A., Koutsilieris, M., 2007. The role of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in skeletal muscle physiology. *in vivo*, 21(1), 45-54.
  36. Picard, B., Lefaucheur, L., Berri, C., Duclos, M. J., 2002. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reprod. Nutr. Dev.*, 42(5), 415-431.
  37. Pfaffl, M. W., 2007. Relative quantification. In *Real-time PCR* (pp. 89-108). Taylor & Francis.
  38. Reed, S. A., Raja, J. S., Hoffman, M. L., Zinn, S. A., Govoni, K. E., 2014. Poor maternal nutrition inhibits muscle development in ovine offspring. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 5(1), 1-11.
  39. Scharner, J., Zammit, P. S., 2011. The muscle satellite cell at 50: the formative years. *Skelet. muscle*, 1(1), 1-13.
  40. Sunnucks, P., Hales, D., F., 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Mol. Biol. Evol.*, 13, 510-524.
  41. Van Soest, P. V., Robertson, J. B., Lewis, B., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy sci.*, 74(10), 3583-3597.
  42. Wang, Y. X., Rudnicki, M. A., 2012. Satellite cells, the engines of muscle repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 13(2), 127-133.
  43. Yates, D. T., Clarke, D. S., Macko, A. R., Anderson, M. J., Shelton, L. A., Nearing, Allen, R. E., M., Rhoads, R. P., Limesand, S. W., 2014. Myoblasts from intrauterine growth-restricted sheep fetuses exhibit intrinsic deficiencies in proliferation that contribute to smaller semitendinosus myofibres. *J. Physiol.*, 592(14), 3113-3125.
  44. Zhu, M. J., Ford, S. P., Nathanielsz, P. W., Du, M., 2004. Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biol. Reprod.*, 71(6), 1968-1973.

**Table 1.** Primers used for real time qPCR quantification.

| Gene <sup>1</sup> | Accession# <sup>2</sup> |   | Primer sequence <sup>3</sup> | Length(bp) | Efficiency |
|-------------------|-------------------------|---|------------------------------|------------|------------|
| IGF-1             | XM_012159659            | F | TCGCATCTCTCTCTATGGCCCTGT     | 240        | 0.90       |
|                   |                         | R | GCAGTACATCTCCAGCCTCCTCAGA    |            |            |
| PPARG             | NM_001100921            | F | CCCTGGCAAAGCATTGTAT          | 222        | 1.00       |
|                   |                         | R | ACTGACACCCCTGGAAGATG         |            |            |
| PAX7              | XM_027965644            | F | GAGACCGACTGCTGAAGGAC         | 156        | 0.95       |
|                   |                         | R | ATGCTGTGCTTGGCTTTCTT         |            |            |
| MyHC-I            | XM_004010325            | F | TCGTCAAGGCCACAATTTTG         | 101        | 0.91       |
|                   |                         | R | CTGCTGCAACACCTGGTCCT         |            |            |
| GLUT-4            | XM_027974995            | F | ATTGGCATGGGTTTCCAGTA         | 201        | 1.01       |
|                   |                         | R | GCAGTTCTGTGCTGGGTTTCA        |            |            |
| MYOGENIN          | NM_001174109            | F | CAGTGAATGCAGCTCCCAT          | 159        | 1.06       |
|                   |                         | R | TCCTCCACTGTGATGCTGTC         |            |            |
| HPRT1             | XM_015105023            | F | TGGAGAAGGTGTTTATTCCTC        | 105        | 1.00       |
|                   |                         | R | CACAGAGGGCCACAATGTGA         |            |            |
| ACTB              | NM_001009784            | F | GGACCTGACGGACTACCTCATG       | 136        | 0.97       |
|                   |                         | R | GGCCATCTCTGCTCGAAGT          |            |            |

<sup>1</sup> paired box 7 transcript variant X1 (PAX7); hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT1);  $\beta$ -actin (ACTB).

<sup>2</sup>Gene bank sequences.

<sup>3</sup>F = foreword; R = reverse

<sup>3</sup>Gene bank sequences and links:

IGF-1: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM\\_012159659](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM_012159659)

PPARG: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_001100921](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_001100921)

PAX7: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM\\_027965644](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM_027965644)

MyHC-I: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM\\_004010325](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM_004010325)

GLUT-4: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM\\_027974995](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM_027974995)

MYOGENIN: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_001174109](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_001174109)

HPRT1: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM\\_015105023](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM_015105023)

ACTB: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_001009784](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_001009784)

**Table 2.** Plasma glucose, cholesterol, NEFA, total protein, albumin, urea, insulin and IGF-I concentrations in HPA and LPA newborn lambs. Data are expressed as means  $\pm$  SEM.

| Metabolites and hormones | HPA <sup>1</sup> | LPA <sup>2</sup> | P value |
|--------------------------|------------------|------------------|---------|
| Glucose (mmol/L)         | 4.6 $\pm$ 0.7    | 3.0 $\pm$ 0.9    | 0.14    |
| Cholesterol (mmol/L)     | 1.9 $\pm$ 0.2    | 1.7 $\pm$ 0.3    | 0.65    |
| NEFA (mmol/L)            | 1.8 $\pm$ 0.2    | 1.40 $\pm$ 0.2   | 0.25    |
| Total protein (g/L)      | 74.8 $\pm$ 8.8   | 83.4 $\pm$ 11.1  | 0.47    |
| Albumin (g/L)            | 29.9 $\pm$ 2.9   | 23.8 $\pm$ 3.6   | 0.15    |
| Urea (mmol/L)            | 10.8 $\pm$ 0.9   | 11.2 $\pm$ 1.3   | 0.82    |
| Insulin ( $\mu$ U/mL)    | 10.2 $\pm$ 2.3   | 4.7 $\pm$ 2.4    | 0.12    |
| IGF-I (ng/mL)            | 271.7 $\pm$ 36.8 | 248.9 $\pm$ 43.5 | 0.70    |

Within the same row means followed by different superscripts differed (a vs b;  $P \leq 0.05$ ) or tended to differ (x vs y;  $P \leq 0.10$ ).

<sup>1</sup> HPA: High pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 10 (March-June) - 12 (July) kg dry matter (DM)/100 kg of LW/day. n = 9.

<sup>2</sup> LPA: Low pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 5 (March-June) - 8 (July) kg DM/100 kg of LW/day. n = 9.

**Table 3.** Histological and molecular variables of the *Longissimus lumborum* and *Semitendinosus* muscle in newborn HPA and LPA lambs. Data are expressed as means  $\pm$  SEM.

|                                                           | <i>Longissimus lumborum</i>   |                               |         | <i>Semitendinosus</i>        |                              |         |
|-----------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------|------------------------------|------------------------------|---------|
|                                                           | HPA <sup>1</sup>              | LPA <sup>2</sup>              | P-value | HPA <sup>1</sup>             | LPA <sup>2</sup>             | P-value |
| Fiber Diameter ( $\mu$ )                                  | 29.82 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup> | 20.85 $\pm$ 0.97 <sup>b</sup> | <0.0001 | 25.1 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>  | 21.3 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>  | 0.0058  |
| Fiber density/ $\mu$ m <sup>2</sup> (x 10 <sup>-4</sup> ) | 4.05 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>   | 3.12 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>   | 0.005   | 4.6 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>  | 3.7 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>  | 0.09    |
| N <sup>o</sup> nuclei/Fiber                               | 1.76 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>  | 1.26 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>  | <0.0001 | 1.30 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> | 1.09 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup> | <0.0001 |
| Muscle tissue (%)                                         | 42.27 $\pm$ 1.90 <sup>a</sup> | 32.24 $\pm$ 1.90 <sup>b</sup> | 0.002   | 53.3 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>  | 43.4 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>  | 0.025   |
| Non-muscle tissue (%)                                     | 57.73 $\pm$ 1.90 <sup>b</sup> | 67.76 $\pm$ 1.90 <sup>a</sup> | 0.002   | 46.7 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>  | 56.6 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>  | 0.025   |
| RNA (mg/g tissue)                                         | 1.03 $\pm$ 0.08               | 1.09 $\pm$ 0.08               | 0.58    | 0.99 $\pm$ 0.09              | 0.98 $\pm$ 0.09              | 0.91    |
| DNA (mg/g tissue)                                         | 4.5 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>   | 3.5 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>   | 0.02    | 4.6 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>  | 3.0 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>  | 0.004   |
| PR (mg/g tissue)*                                         | 198.8 $\pm$ 5.1               | 203.8 $\pm$ 5.8               | 0.53    | 204.9 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup> | 191.2 $\pm$ 3.5 <sup>b</sup> | 0.01    |
| PR/RNA                                                    | 200.2 $\pm$ 23.2              | 201.3 $\pm$ 25.1              | 0.88    | 213.9 $\pm$ 21.3             | 203.0 $\pm$ 24.1             | 0.74    |
| PR/DNA                                                    | 45.5 $\pm$ 4.7 <sup>b</sup>   | 61.7 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>   | 0.04    | 46.7 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>  | 68.9 $\pm$ 5.8 <sup>a</sup>  | 0.02    |

Within the same row means followed by different superscripts differed (a vs b;  $P \leq 0.05$ ) or tended to differ (x vs y;  $P \leq 0.10$ ).

<sup>1</sup> HPA: High pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 10 (March-June) - 12 (July) kg dry matter (DM)/100 kg of LW/day. n = 9.

<sup>2</sup> LPA: Low pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 5 (March-June) - 8 (July) kg DM/100 kg of LW/day. n = 9.

**Table 4.** Specific gene expression on muscles *Longissimus lumborum* and *Semitendinosus* from newborn HPA and LPA lambs. Data are expressed as means  $\pm$  SEM.

|               | <i>Longissimus lumborum</i>      |                                  |         | <i>Semitendinosus</i>             |                                  |         |
|---------------|----------------------------------|----------------------------------|---------|-----------------------------------|----------------------------------|---------|
|               | HPA <sup>1</sup>                 | LPA <sup>2</sup>                 | P-value | HPA <sup>1</sup>                  | LPA <sup>2</sup>                 | P-value |
| <i>MYHC I</i> | 0.4528 $\pm$ 0.1541 <sup>b</sup> | 0.7388 $\pm$ 0.1541 <sup>a</sup> | 0.0529  | 0.4274 $\pm$ 0.1602               | 0.7609 $\pm$ 0.1498              | 0.1440  |
| <i>GLUT-4</i> | 0.4629 $\pm$ 0.2584 <sup>b</sup> | 1.142 $\pm$ 0.2988 <sup>a</sup>  | 0.0647  | 0.2030 $\pm$ 0.05548              | 0.2964 $\pm$ 0.04995             | 0.2155  |
| <i>PAX7</i>   | 0.5307 $\pm$ 0.4510 <sup>b</sup> | 1.3813 $\pm$ 0.4219 <sup>a</sup> | 0.0663  | 0.4104 $\pm$ 0.2975 <sup>b</sup>  | 1.0205 $\pm$ 0.2877 <sup>a</sup> | 0.0319  |
| <i>MYOGEN</i> | 0.4761 $\pm$ 0.1492              | 0.7823 $\pm$ 0.1218              | 0.1359  | 0.5811 $\pm$ 0.2422               | 0.8451 $\pm$ 0.2357              | 0.2122  |
| <i>PPARG</i>  | 0.7473 $\pm$ 0.1304              | 0.7874 $\pm$ 0.1304              | 0.8310  | 0.7359 $\pm$ 0.1237               | 0.4483 $\pm$ 0.1237              | 0.1286  |
| <i>IGF-I</i>  | 2.4590 $\pm$ 0.5330 <sup>a</sup> | 0.5828 $\pm$ 0.6093 <sup>b</sup> | 0.0361  | 0.6725 $\pm$ 0.09454 <sup>a</sup> | 0.3726 $\pm$ 0.1011 <sup>b</sup> | 0.0494  |

Within the same row means followed by different superscripts differed (a vs b;  $P \leq 0.05$ ) or tended to differ (x vs y;  $P \leq 0.10$ ).

<sup>1</sup> HPA: High pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 10 (March-June) - 12 (July) kg dry matter (DM)/100 kg of LW/day. n = 9.

<sup>2</sup> LPA: Low pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 5 (March-June) - 8 (July) kg DM/100 kg of LW/day. n = 9.

**4. EFECTOS DE UNA MENOR OFERTA DE FORRAJE DE CAMPO NATURAL DURANTE LA GESTACIÓN Y DEL SEXO DE LA CRÍA SOBRE EL CRECIMIENTO, EL DESEMPEÑO PRODUCTIVO Y LA APTITUD CARNICERA DE CORDEROS PESADOS**

SEX-DEPENDENT EFFECTS OF MATERNAL UNDERNUTRITION ON GROWTH PERFORMANCE, CARCASS CHARACTERISTICS AND MEAT QUALITY OF LAMBS. 2019. Javier Ithurrealde, Raquel Pérez-Clariget, Florencia Corrales, Danilo Fila, Álvaro López-Pérez, María de Jesús Marichal, Ali Saadoun y Alejandro Bielli. Este artículo fue publicado en la revista *Livestock Science*.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de una subnutrición inducida mediante una menor oferta de forraje de campo natural desde el día 30 hasta el día 143 de gestación sobre el crecimiento, el desempeño productivo y la aptitud carnicera de corderos pesados machos y hembras de 200 días de vida. El trabajo está enmarcado en lo que fue el experimento número 2 de la tesis, cuya etapa de campo se realizó en dos etapas: una primera etapa de tratamiento de ovejas gestantes y cría de los corderos hasta el destete realizada en la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt de la Facultad de Agronomía (Udelar), Uruguay (32° S, 54° W) entre marzo y diciembre de 2016, y una segunda etapa de confinamiento y engorde de los corderos hasta la faena realizada en la Estación de Pruebas de la Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay, entre diciembre de 2016 y abril de 2017. Brevemente, el experimento consistió en someter a dos grupos de ovejas a dos ofertas de forraje incrementales de campo natural contrastantes [alta oferta = 14 a 20 kg MS/100 kg de PC por día; n = 16 (8 gestantes de machos y 8 gestantes de hembras) y baja oferta = 5 a 10 kg MS/100 kg de PC por día; n = 17 (7 gestantes de machos y 10 gestantes de hembras)] entre los días 30 y 143 de gestación. Desde el día 143 hasta el destete (90 días) las ovejas pastorearon sin restricciones en campo natural y fueron suplementadas colectivamente con afrechillo de arroz. Luego del destete, los corderos fueron alojados en corrales individuales y alimentados *ad libitum* hasta los 200 días de vida, momento en el que fueron faenados. Los resultados obtenidos demostraron que una subnutrición inducida por una menor oferta de forraje de campo natural produjo un marcado efecto sobre el crecimiento, la

calidad de la canal y los pesos musculares individuales en los músculos de corderos de 200 días de vida, aunque estos efectos operaron de un modo fundamentalmente sexo-dependiente. La subnutrición materna redujo el peso al destete, la ganancia de peso durante el engorde y el área ultrasonográfica del músculo *longissimus* en corderos machos, pero no en hembras. Por otra parte, la subnutrición materna afectó negativamente la calidad de la carcasa y redujo los pesos musculares individuales, principalmente en corderos machos y no en hembras. Asimismo, la subnutrición materna también fue capaz de afectar algunas características de calidad de la carne como el color instrumental y el pH, aunque la mayoría de estos efectos dependieron tanto del músculo evaluado como del sexo del cordero. En síntesis, los resultados del trabajo indican que una subnutrición inducida por una menor oferta de campo natural entre el día 30 y 143 de gestación induce efectos de programación fetal sobre el desempeño productivo evidenciables en animales de 200 días de vida. No obstante, nuestros resultados demuestran que la mayoría de estos efectos dependen del sexo de la progenie, indicando que los corderos machos son los que resultan más afectados por la nutrición materna en términos de capacidad de crecimiento y aptitud carnicera. Esto implica que, independientemente de las condiciones posnatales, las alteraciones acontecidas durante la vida intrauterina de los corderos se traducen en una afectación negativa de la habilidad de los animales para crecer, así como también de la cantidad de carne producida.



Contents lists available at ScienceDirect

Livestock Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/livsci](http://www.elsevier.com/locate/livsci)

## Sex-dependent effects of maternal undernutrition on growth performance, carcass characteristics and meat quality of lambs



Javier Ithurrealde<sup>a,\*</sup>, Raquel Pérez-Clariget<sup>a</sup>, Florencia Corrales<sup>a</sup>, Danilo Fila<sup>b</sup>,  
Álvaro López-Pérez<sup>a</sup>, María de Jesús Marichal<sup>a</sup>, Ali Saadoun<sup>c</sup>, Alejandro Bielli<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Garzón 780, Montevideo 12900, Uruguay

<sup>b</sup> Departamento de Reproducción, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, A. Las Plazas 1550, Montevideo 11600, Uruguay

<sup>c</sup> Sección Fisiología y Nutrición, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Igua 4225, Montevideo 11400, Uruguay

<sup>d</sup> Departamento de Morfología y Desarrollo, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, A. Las Plazas 1550, Montevideo 11600, Uruguay

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Fetal programming  
Sheep  
Meat quality  
Carcass quality

### ABSTRACT

The present study evaluated the sex-specific effects of maternal undernutrition induced by a lower natural pasture allowance (between gestation days 30 and 143) on growth performance, carcass and meat quality of lambs. Thirty-three single-bearing multiparous Corriedale ewes were randomly assigned to two natural pasture allowances: a) Sixteen HPA (high pasture allowance) ewes (eight carrying male and eight carrying female lambs) grazed on 14–20 kg of dry matter (DM)/100 kg of body weight (BW)/day; and b) Seventeen LPA (low pasture allowance) ewes (seven carrying male and ten carrying female lambs) grazed on 6–10 kg of DM/100 kg of BW/day. From gestation day 100 ewes were supplemented with rice bran. From gestation day 143 until weaning all animals grazed on natural pasture with unlimited availability and continued to be supplemented. After weaning lambs were individually ad libitum fed with a mixed diet (alfalfa hay and commercial mixed ration) until slaughtering at 200 days old. High pasture allowance ewes showed greater mean gestational BW ( $P < 0.01$ ), with differences between groups from day 55 on. Body weight differences between HPA and LPA ewes carrying female fetuses appeared earlier and were more profound ( $P < 0.05$ ) than those detected between ewes carrying male fetuses. Maternal undernutrition affected male ( $P = 0.05$ , sex-by-age-by-treatment and  $P = 0.01$ , sex-by-treatment interactions for lactation and fattening periods, respectively) but not female lamb growth. Carcass conformation and meat yield were affected by maternal undernutrition mostly in a sex-dependent manner. Male LPA lambs showed reduced area ( $P = 0.03$ , sex-by-treatment interaction) and tended to show reduced perimeter ( $P = 0.07$ , sex-by-treatment interaction) of the *Longissimus* muscle. Male LPA lambs showed narrower ( $P < 0.01$ , sex-by-treatment interaction) and tended to show less compact carcasses ( $P = 0.09$ , sex-by-treatment interaction) and reduced buttock perimeters ( $P = 0.08$ , sex-by-treatment interaction). Sex-dependent muscle weight reduction was found for muscles *Gluteobiceps*, *Supraspinatus* and *Semitenidosus* ( $P = 0.02$ , sex-by-treatment interaction), with males but not females being affected. Maternal undernutrition affected meat quality in a sex-dependent manner, generally increasing meat lightness in most muscles from females, but not males. In conclusion, a reduced forage allowance of ewes from gestation day 30 until partum affected growth performance, carcass and meat quality of lambs mostly in a sex-dependent manner. Generally, males born to undernourished ewes grew more slowly and showed poorer quality carcasses and reduced meat yields, while females born to undernourished ewes generally showed brighter meat.

### 1. Introduction

Fetal programming is a major concept related to the permanent impacts that gestational insults may have on the offspring (Desai and Hales, 1997). Many prenatal perturbations may contribute to the onset of developmental alterations. However, maternal nutrition is probably

one of the most relevant factors involved in fetal programming (Wu et al., 2006). As reviewed by Grigore et al. (2008) and Moritz et al. (2010) numerous animal and epidemiological human studies indicate the existence of sex-dependent effects regarding the fetal onset of cardiovascular alterations such as hypertension and vascular dysfunction. Furthermore, Muralimanoharan et al. (2017) have

\* Corresponding author.

E-mail address: [javiithu@gmail.com](mailto:javiithu@gmail.com) (J. Ithurrealde).

<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.01.024>

Received 13 July 2018; Received in revised form 13 January 2019; Accepted 30 January 2019  
1871-1413/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

recently demonstrated that maternal undernutrition is associated with sex-dependent alterations in cardiac structure and lipid metabolism in baboons. Sex-specific developmental programming effects have also been demonstrated for the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rodents (McCormick et al., 1995; Lee and Rivier, 1996). Additionally, Rae et al. (2002) demonstrated that a pre-natal undernutrition which had no effect on ovine male reproductive development and adult function, reduced ovulation rate in female progeny.

Although fetal programming of muscle development, growth efficiency and meat production has been a topic of concern, little previous information exists regarding sex-dependent effects of maternal undernutrition on these variables. Skeletal muscle is especially sensitive to fetal programming given its relatively low priority in nutrient partitioning during development as compared to other organs (Close and Pettigrew, 1990). Furthermore, the effects of maternal undernutrition on skeletal muscle development are especially relevant for livestock production, since developmental muscle alterations may result in affecting both meat quantity and quality (Caton and Hess, 2010). In the ovine species, several studies have investigated fetal programming effects on muscle development, growth efficiency, carcass composition and meat quality (Nordby et al., 1987; Daniel et al., 2007; Sen et al., 2015; Piaggio et al., 2018). However, reports evaluating possible sex-specific effects are scarce and somewhat contradictory. According to both Nordby et al. (1987) and Piaggio et al. (2018) no fetal programming sex-dependent effect was observed on lamb growth, muscle development, carcass and meat traits. Controversially, Daniel et al. (2007) reported that male but not female lambs born to mid-gestation restricted ewes showed lighter and fatter *Longissimus dorsi* muscles.

Although Sen et al. (2015) evaluated fetal programming effects on animal growth, muscle development and meat quality of both male and female lambs, the authors used the sex of lambs as a cofactor in the statistical model in order to eliminate its effect on data. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the sex-specific effects of maternal undernutrition induced by a lower natural pasture allowance from day 30 to day 143 of gestation on growth performance, carcass characteristics, meat yield and meat quality (instrumental color and pH) in the major muscles of lambs. We hypothesized that maternal undernutrition would differently affect growth performance, carcass characteristics and meat quality of lambs depending on their sex.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Location and experimental treatments

All experimental procedures were approved by the Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA, Facultad de Agronomía, Universidad de la República). The experiment included two phases. The first phase included the experimental treatments applied to pregnant ewes, as well as lambs' breeding until weaning, and was performed at Estación Experimental Bernardo Rosengurt, Facultad de Agronomía (Cerro Largo, Uruguay; 32.3769° S, 54.1654° W). The second phase included lambs' fattening until slaughter and was performed at an animal house, Facultad de Agronomía (Montevideo).

#### 2.1.1. Nutritional treatments applied to pregnant ewes

The experimental design (nutritional treatments applied to pregnant ewes during the first phase) has been previously described (Freitas de Melo et al., 2018). Briefly, multiparous Corriedale ewes were estrus synchronized and cervically inseminated with fresh semen from two randomly distributed Corriedale rams 12 h after estrus detection (day 0). Thirty days after, pregnancy and fetal number were determined by transrectal ultrasound (AlokaProSound 2, Aloka Co. Ltd; Tokyo, Japan, 7.5 MHz probe). Single-bearing ewes were randomly assigned to two different natural pasture allowances from day 30 to day 143 of gestation. Sixteen (eight carrying male and eight carrying female lambs) and seventeen ewes (seven carrying male and ten carrying female lambs)

grazed on high and low pasture allowance (HPA and LPA), respectively. Pasture allowances offered to HPA ewes were 14, 15 and 20 kg of dry matter/100 kg of body weight/day on days 30–60, 61–110 and 111–143 of gestation, respectively. Pasture allowances offered to LPA ewes were 6, 5 and 10 kg of dry matter/100 kg of body weight/day on days 30–60, 61–110 and 111–143 of gestation, respectively. Each experimental group had three replications in one of three independent paddocks separated by electric fences (randomized block design with three replicates). From day 100 of gestation until lambing, ewes were daily supplemented with 300 g/animal of rice bran (88% DM, 14% crude protein, 9% acid detergent fiber and 24% neutral detergent fiber) and from day 143 of gestation until weaning (90-day old lambs) all animals were kept in the same paddock grazing on non-restrictive natural pasture allowances and continued to be daily supplemented with the same amount of rice bran until weaning. Pasture availability was determined monthly (Haydock and Shaw, 1975) and forage allowance was adjusted by including or removing “put-and-take” ewes from each paddock according to the BW of all ewes (Freitas de Melo et al., 2015). Also, pasture consumption, metabolizable energy, crude protein and estimated energy and protein balance of ewes grazing on HPA and LPA natural pasture allowance during gestation were calculated and previously reported (Freitas de Melo et al., 2018). Estimated energy balance always remained over 100% in the HPA ewes (175, 134 and 165%, on days 50, 100 and 143 of gestation, respectively), but not in the LPA ewes (122, 69 and 156% on days 50, 100 and 143 of gestation, respectively). Estimated protein balance was 117, 78 and 92% for HPA ewes on days 50, 100 and 143 of gestation, respectively, and 76, 41 and 88% for LPA ewes on days 50, 100 and 143 of gestation, respectively (Freitas de Melo et al., 2018). All ewes were shorn 30 days after lambing and the weight of the fleeces were registered. All animals were subjected to a standard flock health plan, including parasite control program and vaccination schedule (commercial vaccines against contagious ecthyma and clostridial diseases, as well as commercial polyvalent inactivated vaccines against enteric and respiratory conditions).

#### 2.1.2. Lamb fattening and slaughtering

Lambs were weaned at 90 days old and transported to an animal house (Estación de Pruebas, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay) for fattening until slaughtering at 200 days old. Animals were housed in individual pens (155 × 65 cm) and maintained throughout the fattening period with free access to water. Lambs were ad libitum fed with a mixed diet composed of alfalfa hay and a complete commercial mixed ration (16% proteins; 2% ether extract, 13% moisture, 19% crude fiber, 9% total minerals) starting with an adaptation period during which the hay-concentrate ratio was adjusted every three days, varying from 80–20 to a 20–80 ratio. Total daily food offered was adjusted to 6% of the individual lambs' body weight every 15 days considering each lamb's body weight and each lamb's previous mean daily weight gain. Daily ration was separated in two equal parts, offered to lambs in the morning and in the afternoon. At 200 days old, all lambs were slaughtered following standard procedures (electrical stunning, bleeding, skinning and evisceration) in a mobile slaughterhouse (Unidad de Faena Móvil, Instituto Nacional de Carnes, Uruguay).

#### 2.2. Body weight, body condition score and serum biochemical analyses of ewes

The body weight (BW) and body condition score (BCS; 1 = emaciated to 5 = obese; Jefferies, 1961) of all ewes were recorded in the morning (from 08:00 h to 10:00 h) on days 30, 55, 70, 85, 105, 120 and 143 of gestation. The BW of all ewes was corrected for estimated fleece (Gastel et al., 1995) and fetal (Koong et al., 1975) weight. Blood samples from all ewes were collected in the morning from the jugular vein using heparinized tubes (16 × 100 mm; 0.05 ml of 1:10 diluted sodium heparin) on days 30, 100 and 143 of gestation. Samples were

centrifuged for 10 min at 1500 g and the plasma was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Glucose and cholesterol blood levels, serum total protein and albumin concentrations were measured by colorimetry using commercial kits (Bio-Systems, Barcelona, Spain).

### 2.3. Udder volume and milk production of ewes

Udder volume was calculated at day 143 of gestation from the following udder measurements: circumference of the udder near the belly, udder width from left to right insertion of the udder and udder depth from insertion of the udder to the inferior extremity, as described by Freitas de Melo et al. (2018). Milk production was calculated according to Freitas de Melo et al. (2018) at day 91 of postpartum.

### 2.4. Lambs' body weight, body and ultrasound measurements and productive records

Lambs' BW was recorded at birth, at day 45, and at weaning (90 days old). During the fattening period, lambs were weighed every 15 days until slaughter. The thoracic perimeter (perimeter at the sternal xiphoid process), cranio-caudal length (distance between the atlanto-occipital and the sacrococcygeal joints), and the left hind limb perimeter (maximum perimeter at hind limb length) were measured at birth and at days 45 and 200. The growth index was calculated as follows:  $GI = \text{birth weight}/\text{cranio-caudal length at birth}^{1.5}$  (Gootwine, 2013). The area and perimeter of muscle *Longissimus dorsi* at the last intercostal space were determined on days 45 and 126 using an ultrasound scanner (MyLabOne, Esaote, Italy, 3.5 MHz probe). During the fattening period, individual feed refusal was daily measured before morning feeding in order to record each lamb's daily feed intake. Average individual daily gain and feed conversion ratio (kg of consumed food necessary to gain 1 kg of BW) were also calculated. Daily mean feed intake and weight gain were also expressed as a proportion of each lamb's mean metabolic weight.

### 2.5. Carcass measurements, organs' and muscles' weights and meat quality determinations

Hot carcass weight was determined immediately after slaughter. Liver, heart, adrenal glands' and kidneys' weights were recorded immediately after evisceration. Carcass conformation measurements were taken after having chilled carcasses at  $4^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Carcass width (widest carcass measurement at the ribs), thoracic depth (maximum distance between the sternum and the back of the carcass at the sixth thoracic vertebra), buttock width and perimeter (widest buttock measurement in a horizontal plane on the hanging carcass), hind limb length (length from perineum to distal edge of the tarsus) and internal carcass length (length from cranial edge of the symphysis pelvis to the cranial edge of the first rib) were determined according to Cañeque et al. (2004). Additionally, chest roundness index (carcass width/thoracic depth), carcass compactness (cold carcass weight/

internal carcass length) and leg compactness (leg weight/hind limb length) were calculated (Velasco et al., 2000). Subcutaneous fat thickness was measured using a calliper at 4 cm from the spinal column over the 13th rib (Cañeque et al., 2004).

Immediately after taking cold carcass conformation measurements, left side *Supraspinatus*, *Infraspinatus*, *Psoas major*, *Longissimus lumborum*, *Gluteus medius*, *Gluteobiceps*, *Semimembranosus* and *Semitendinosus* muscles were dissected free from visible fat and connective tissue and weighed. Each muscle's pH was measured by inserting the spear-head electrode of a pH meter (LT Lutron pH-201) into the central superficial part of each muscle at 45 min *postmortem* (pH<sub>45</sub>) and at 24 h *postmortem* (pH<sub>24</sub>). Therefore, each muscle's pH variation was calculated as  $\text{pH}_{45} - \text{pH}_{24}$ . Instrumental meat color was determined using a colorimeter device (Minolta CR-10, Osaka, Japan) for each muscle 24 h *postmortem*. CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) lightness ( $L^*$ ), redness ( $a^*$ ) and yellowness ( $b^*$ ) were determined by triplicate, and each coordinate value was expressed as the mean value of the three determinations. Measurement conditions were with illuminant D65, an observation angle of  $10^{\circ}$  and an aperture size of 0.31 inches. The hue ( $h^*$ ) and chroma ( $C^*$ ) color parameters were also calculated as follows  $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$  and  $h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*)$  according to Vergara et al. (1999).

### 2.6. Statistical analysis

All data were analyzed in a randomized block design using the SAS Systems software (SAS 9.0 V; SAS Institute, Cary, NC, USA). Ewes' BW, BCS, glucose, cholesterol, serum total protein and albumin plasma concentrations, as well as lambs' BW, lambs' body measurements, ultrasound determinations, lambs' productive records and muscle pH values were analyzed as repeated measures using the MIXED procedure. Carcass and meat quality traits were analyzed using a mixed model (PROC MIXED). The adjusted models included the treatment (HPA vs. LPA), the repeated effect (for those variables analyzed as repeated measurements), the sex, and their interactions as fixed effects and the block as random effect. The interaction between treatment and block was included in the models as random effect but it was removed from them when the estimate of the covariance parameter was zero or near zero. Data of lambs' BW during the lactating period were re-analyzed including ewes' BW at lambing as a covariate. Hot carcass weight was included as a covariate for the analysis of individual muscle traits when the effect of treatment was significant to determine if differences in muscles weights were independent of carcass weight. Post-hoc comparisons were done with the Tukey–Kramer test. Statistical differences were considered when  $P \leq 0.05$ , and tendencies when  $0.05 < P \leq 0.10$ . Data are expressed as least square means  $\pm$  s.e.m.

**Table 1**

Body weights and BCS (means  $\pm$  pooled s.e.m) of HPA and LPA ewes at different days of gestation.

|                        | HPA<br>Body weight (kg)       | BCS                          | LPA<br>Body weight (kg)       | BCS                          |
|------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Mean gestational value | 45.18 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup> | 3.28 $\pm$ 0.04 <sup>A</sup> | 42.09 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup> | 3.20 $\pm$ 0.04 <sup>A</sup> |
| Day 30                 | 45.13 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup> | 3.49 $\pm$ 0.07 <sup>A</sup> | 45.22 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup> | 3.48 $\pm$ 0.06 <sup>A</sup> |
| Day 55                 | 46.62 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup> | 3.43 $\pm$ 0.07 <sup>A</sup> | 44.43 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup> | 3.54 $\pm$ 0.06 <sup>A</sup> |
| Day 70                 | 45.99 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup> | 3.40 $\pm$ 0.07 <sup>A</sup> | 42.79 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup> | 3.54 $\pm$ 0.06 <sup>A</sup> |
| Day 85                 | 44.64 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup> | 3.33 $\pm$ 0.07 <sup>A</sup> | 40.83 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup> | 3.21 $\pm$ 0.06 <sup>A</sup> |
| Day 105                | 41.42 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup> | 3.18 $\pm$ 0.07 <sup>A</sup> | 35.99 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup> | 2.83 $\pm$ 0.06 <sup>B</sup> |
| Day 120                | 45.12 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup> | 2.99 $\pm$ 0.07 <sup>A</sup> | 41.38 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup> | 2.95 $\pm$ 0.06 <sup>A</sup> |
| Day 143                | 47.37 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup> | 3.18 $\pm$ 0.07 <sup>A</sup> | 43.99 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup> | 2.86 $\pm$ 0.06 <sup>B</sup> |

Within the same row (day of gestation) those BW (a vs b) or BCS (A vs B) followed by different superscripts differed ( $P < 0.05$ ).

### 3. Results

#### 3.1. Ewes' body weights, body condition scores, and serum biochemical analyses

Ewes from the HPA group showed greater mean gestational BW ( $P < 0.01$ ), while no differences were detected regarding mean BCS ( $P = 0.33$ ) (Table 1). An interaction between the nutritional treatment and the day of gestation was detected for both BW and BCS ( $P < 0.01$ ). Differences between HPA and LPA ewes' BW were detected from day 55 on, until day 143, while BCS differences between groups were detected only at days 105 and 143 of gestation (Table 1). Offspring-sex did not affect ewes' BW ( $P = 0.75$ ) or BCS ( $P = 0.13$ ). However, an interaction between treatment and offspring-sex ( $P = 0.04$ ) and a trend for an interaction between treatment, offspring-sex and day of gestation ( $P = 0.07$ ) were found for ewes' BW. Mean gestational BW differences between HPA ( $45.90 \pm 0.54$  kg) and LPA ( $41.69 \pm 0.45$  kg) ewes carrying female fetuses were more profound ( $P < 0.01$ ) than those detected between HPA ( $44.52 \pm 0.52$  kg) and LPA ( $42.75 \pm 0.59$  kg) ewes carrying male fetuses ( $P = 0.03$ ). Regarding the triple interaction between treatment, offspring-sex and day of gestation for ewes' BW, differences between HPA and LPA ewes carrying female fetuses appeared earlier and were more profound than those detected between HPA and LPA ewes carrying male fetuses (Table 2).

Ewes' nutritional treatment affected cholesterol ( $P = 0.02$ ), albumin ( $P < 0.01$ ) and total serum protein concentrations ( $P < 0.01$ ). HPA ewes showed higher mean cholesterol ( $81.14 \pm 2.61$  vs.  $75.54 \pm 2.51$  mg/dL), albumin ( $3.23 \pm 0.03$  vs.  $3.09 \pm 0.03$  g/dL) and total serum protein concentrations ( $6.57 \pm 0.09$  vs.  $6.19 \pm 0.09$  g/dL) than LPA ewes. An interaction between treatment and day of gestation was found for total serum protein ( $P < 0.01$ ) and albumin concentration ( $P < 0.01$ ): both total serum protein and albumin plasma concentrations decreased more in LPA than in HPA ewes from day 30 to day 143 of gestation (data not shown). Moreover, a strong trend for a triple interaction between treatment, offspring-sex and day of gestation was found for ewes' blood glucose levels ( $P = 0.07$ ). Within ewes carrying male fetuses, those on the LPA treatment showed a strong decline in their blood glucose levels from day 30 until day 143. However, for HPA ewes carrying male fetuses blood glucose level declined from day 30 to day 100 after which it leveled off. Regarding ewes carrying female fetuses, in the LPA group no differences were detected in blood glucose levels throughout gestation. However, those HPA ewes carrying female fetuses showed a decline in their blood glucose levels between days 30 and 143 of gestation (Fig. 1).

#### 3.2. Ewes' udder volume and milk production

HPA ewes showed greater udder volumes ( $1601.1 \pm 157.2$  cm<sup>3</sup> vs.  $1003.33 \pm 140.2$  cm<sup>3</sup>;  $P = 0.01$ ) than LPA ewes. Although the

**Table 2**  
Body weights (kg; means  $\pm$  pooled s.e.m) of HPA and LPA ewes carrying male or female fetuses throughout gestation.

|         | HPA<br>Males                  | Females                       | LPA<br>Males                  | Females                       |
|---------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Day 30  | 45.21 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup> | 45.11 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup> | 45.15 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup> | 45.22 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup> |
| Day 55  | 45.76 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup> | 47.53 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup> | 44.60 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup> | 44.30 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup> |
| Day 70  | 45.32 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup> | 46.73 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup> | 44.19 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup> | 41.99 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup> |
| Day 85  | 43.79 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup> | 45.53 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup> | 41.79 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup> | 40.27 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup> |
| Day 105 | 40.34 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup> | 42.56 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup> | 37.29 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup> | 35.25 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup> |
| Day120  | 44.31 $\pm$ 0.71 <sup>b</sup> | 45.99 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup> | 42.29 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup> | 40.85 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup> |
| Day143  | 46.94 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup> | 47.87 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup> | 43.91 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup> | 44.00 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup> |

Within the same row (day of gestation) and sex, those means followed by different superscripts were (a vs b) or tended (x vs y) to be different ( $P < 0.05$  or  $P < 0.1$ , respectively).

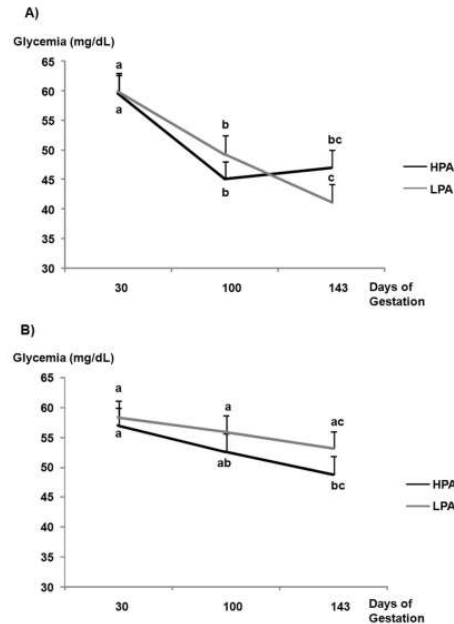


**Fig. 1.** Mean blood glucose values of HPA and LPA ewes carrying male (A) or female (B) fetuses throughout gestation. Those values not followed by the same superscript indicate significant differences between experimental groups and/or days of gestation ( $P < 0.05$ ).

treatment did not influence milk production ( $0.48 \pm 0.05$  kg vs.  $0.39 \pm 0.05$  kg; HPA vs. LPA, respectively,  $P = 0.16$ ), an interaction between offspring-sex and treatment was detected ( $P = 0.02$ ). Maternal undernutrition during gestation reduced milk production in those ewes breeding male ( $0.56 \pm 0.07$  kg vs.  $0.33 \pm 0.07$  kg; HPA vs. LPA, respectively,  $P = 0.02$ ) but not female ( $0.40 \pm 0.07$  kg vs.  $0.45 \pm 0.06$  kg; HPA vs. LPA, respectively,  $P = 0.48$ ) lambs.

#### 3.3. Lambs' body weights, body measurements and ultrasound determinations

Lambs' BW from birth until weaning was not affected by ewes' nutritional treatment ( $P = 0.11$ ), or by lamb sex ( $P = 0.99$ ). However, a triple interaction between treatment, sex and age was found ( $P = 0.05$ ). No differences were detected between HPA and LPA lambs at birth, independently from sex. However, male HPA lambs tended to be heavier at day 45 ( $P = 0.08$ ) and were heavier ( $P < 0.01$ ) at day 90 than LPA male lambs, while no differences were detected between female HPA and LPA lambs (Table 3). These effects persisted ( $P = 0.03$ , sex-by-treatment interaction) even when ewes' body weights at lambing were included as a covariate for the analysis. Regarding the fattening period, ewes' nutritional treatment did not affect lamb body weight ( $P = 0.11$ ). However, an interaction between sex and treatment was detected ( $P = 0.01$ ). During the fattening period the mean BW of male HPA lambs was greater ( $P < 0.01$ ) than the mean BW of male LPA lambs, while no differences were detected between HPA and LPA female lambs (Table 4).

Ewes' nutritional treatment did not affect lamb thoracic perimeter,

Table 3

Birth, 45-day old and weaning body weights (kg; means  $\pm$  s.e.m) of male and female lambs born to HPA and LPA ewes.

|                  | HPA<br>Females                | Males                         | LPA<br>Females                | Males                         |
|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Birth            | 4.34 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>  | 4.75 $\pm$ 0.91 <sup>A</sup>  | 4.29 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>  | 4.24 $\pm$ 0.95 <sup>A</sup>  |
| Day 45           | 13.63 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup> | 14.28 $\pm$ 0.91 <sup>X</sup> | 13.72 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>  | 12.26 $\pm$ 0.95 <sup>Y</sup> |
| Weaning (Day 90) | 17.75 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup> | 20.27 $\pm$ 0.93 <sup>A</sup> | 17.97 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup> | 15.95 $\pm$ 0.95 <sup>B</sup> |

Within the same row (lamb age) and sex, those means followed by different superscripts were (a vs b) or tended (x vs y) to be different ( $P < 0.05$  or  $P < 0.1$ , respectively).

cranio-caudal length, and hind limb perimeter ( $P > 0.19$ ). Furthermore, no treatment effect was detected for Gootwine growth index ( $P = 0.11$ ; data not shown).

Ewes' nutritional treatment affected ( $P = 0.02$ ) and tended to affect ( $P = 0.08$ ) *Longissimus dorsi* area and perimeter, respectively. Moreover, a significant interaction between sex and treatment was detected for *Longissimus dorsi* area ( $P = 0.03$ ) while a trend for an interaction between sex and treatment was found for this muscle's perimeter ( $P = 0.07$ ). Male LPA lambs showed smaller area ( $P < 0.01$ ) and perimeter ( $P = 0.02$ ) of the *Longissimus* muscle than HPA male lambs, while no differences were detected for these traits between HPA and LPA female lambs (Table 4).

#### 3.4. Lambs' productive records during the fattening period

Ewes' nutritional treatment affected lamb mean daily weight gain in a sex-independent manner ( $P = 0.05$ ) (Table 4). Moreover, an interaction between treatment and sex was detected for lamb daily mean feed intake ( $P < 0.01$ ). However, when these records were referred to each lamb's mean metabolic weight, the effects disappeared (Table 4). No effects were detected for lamb feed conversion ratio ( $P = 0.82$ ) (Table 4).

#### 3.5. Carcass measurements, organ and muscle weights and meat quality

Ewes' nutritional treatment affected carcass compactness while it tended to affect buttock width and internal carcass length. LPA lambs showed less compact carcasses ( $0.30 \pm 0.02$  vs.  $0.22 \pm 0.02$ ; HPA vs. LPA, respectively,  $P = 0.02$ ) and tended to show narrower buttocks ( $25.3 \pm 0.56$  cm vs.  $23.9 \pm 0.56$  cm; HPA vs. LPA, respectively,  $P = 0.07$ ) and shorter carcasses ( $63.60 \pm 0.73$  cm vs.  $61.96 \pm 0.72$  cm; HPA vs. LPA, respectively,  $P = 0.09$ ). Moreover, an interaction between sex and treatment was detected for carcass width ( $P < 0.01$ ) and heart weight ( $P = 0.03$ ), while a trend for an interaction between sex and treatment was detected for carcass compactness ( $P = 0.09$ ) and buttock perimeter ( $P = 0.08$ ) (Table 5).

Muscle traits for HPA and LPA lambs are shown in Tables 6–9. Ewes' nutritional treatment affected the weight of muscles *Gluteobiceps* ( $P = 0.02$ ) and *Semitendinosus* ( $P = 0.02$ ) and these effects persisted

( $P = 0.04$  for the *Semitendinosus*) or turned into a trend ( $P = 0.07$  for the *Gluteobiceps*) when hot carcass weight was included in the model as a covariate. Additionally, ewes' nutritional treatment tended to affect the weight of muscles *Infraspinatus* ( $P = 0.10$ ), *Gluteus medius* ( $P = 0.07$ ) and *Supraspinatus* ( $P = 0.08$ ). However, when hot carcass weight was included in the model as a covariate, all these trends disappeared. Moreover, an interaction between sex and treatment was detected for the weights of muscles *Gluteobiceps* ( $P = 0.02$ ), *Supraspinatus* ( $P = 0.02$ ) and *Semitendinosus* ( $P = 0.02$ ) and these effects either turned into a trend ( $P = 0.08$  for both the *Semitendinosus* and *Gluteobiceps*) or disappeared ( $P = 0.11$  for *Supraspinatus*) when hot carcass weight was included in the model as a covariate. Also, a lower maternal pasture allowance tended to reduce the weight of muscles *Gluteus medius* ( $P = 0.06$ ) and *Semimembranosus* ( $P = 0.09$ ), exclusively in male lambs. However, when hot carcass weight was included in the model as a covariate, both trends disappeared.

Regarding meat quality traits, LPA female lambs showed increased meat lightness ( $P = 0.04$ ) and tended to show increased meat yellowness ( $P = 0.10$ ) in the *Gluteobiceps* muscle. Also, LPA female lambs showed increased meat lightness ( $P = 0.05$ ) in the *Gluteus medius* muscle. In the *Psoas major* muscle, LPA lambs showed reduced meat redness ( $P = 0.02$ ), yellowness ( $P = 0.03$ ) and chroma ( $P = 0.03$ ), independently from sex, while LPA treatment tended to increase meat lightness ( $P = 0.08$ ) exclusively in female lambs and to reduce meat hue exclusively in male lambs ( $P = 0.08$ ). LPA treatment increased ( $P = 0.04$ ) and tended to increase ( $P = 0.10$ ) meat hue in the *Supraspinatus* and *Semitendinosus* muscles of female lambs, respectively. In the *Semimembranosus* muscle LPA treatment tended to reduce meat redness ( $P = 0.07$ ) independently from sex, while it tended to increase meat lightness ( $P = 0.07$ ) exclusively in female lambs. In the *Gluteobiceps* muscle, LPA tended to reduce pH<sub>45</sub> exclusively in male lambs ( $P = 0.10$ ). In the *Semimembranosus* muscle, LPA tended to increase pH<sub>24</sub> exclusively in male lambs ( $P = 0.09$ ). In the *Longissimus lumborum*, LPA male but not female lambs showed increased mean pH value ( $P < 0.01$ ), and pH<sub>45</sub> ( $P = 0.05$ ). Moreover, LPA treatment increased the rate of pH variation in the *Longissimus lumborum* ( $P = 0.03$ ) and this effect was more pronounced in males than in females ( $P = 0.02$ ).

Table 4

Ultrasound area and perimeter of muscle *Longissimus dorsi* (LD) as well as productive records of HPA and LPA male, female and both pooled sexes lambs during the fattening period: mean body weight (MBW), mean daily weight gain (MDG), mean daily weight gain as a proportion of lamb metabolic weight (MDGM), mean daily feed intake (MDFI), mean daily feed intake as a proportion of lamb metabolic weight (MFIMW) and feed conversion ratio (FCR).

|                            | HPA<br>Pooled males and females | Males                          | Females           | LPA<br>Pooled males and females | Males                          | Females           |
|----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------|
| LD area (cm <sup>2</sup> ) | 7.88 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>    | 8.54 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>   | 7.22 $\pm$ 0.53   | 7.01 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>    | 6.89 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>   | 7.12 $\pm$ 0.51   |
| LD perimeter (cm)          | 6.12 $\pm$ 0.23 <sup>x</sup>    | 6.56 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>   | 5.69 $\pm$ 0.29   | 5.69 $\pm$ 0.23 <sup>y</sup>    | 5.66 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>   | 5.71 $\pm$ 0.27   |
| MBW (Kg)                   | 30.94 $\pm$ 1.00                | 33.31 $\pm$ 1.35 <sup>a</sup>  | 28.56 $\pm$ 1.36  | 28.94 $\pm$ 0.99                | 28.36 $\pm$ 1.44 <sup>b</sup>  | 29.32 $\pm$ 1.22  |
| MDG (Kg)                   | 0.254 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>   | 0.283 $\pm$ 0.02               | 0.224 $\pm$ 0.02  | 0.227 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>   | 0.240 $\pm$ 0.02               | 0.214 $\pm$ 0.01  |
| MDGM (%)                   | 1.98 $\pm$ 0.08                 | 2.09 $\pm$ 0.11                | 1.88 $\pm$ 0.11   | 1.89 $\pm$ 0.08                 | 2.03 $\pm$ 0.08                | 1.74 $\pm$ 0.10   |
| MDFI (g)                   | 1283.1 $\pm$ 38.9               | 1362.1 $\pm$ 49.4 <sup>a</sup> | 1204.2 $\pm$ 49.7 | 1215.9 $\pm$ 38.7               | 1180.2 $\pm$ 51.7 <sup>b</sup> | 1251.6 $\pm$ 45.4 |
| MFIMW (%)                  | 10.22 $\pm$ 0.19                | 10.26 $\pm$ 0.24               | 10.17 $\pm$ 0.25  | 10.20 $\pm$ 0.19                | 10.11 $\pm$ 0.26               | 10.30 $\pm$ 0.22  |
| FCR (Kg)                   | 6.31 $\pm$ 0.49                 | 6.49 $\pm$ 0.68                | 6.13 $\pm$ 0.69   | 6.47 $\pm$ 0.48                 | 6.07 $\pm$ 0.73                | 6.87 $\pm$ 0.62   |

Within the same row and sex, those means followed by different superscripts were (a vs b) or tended (x vs y) to be different ( $P < 0.05$  or  $P < 0.1$ , respectively).

**Table 5**  
Carcass measurements and organ weights of HPA and LPA male and female lambs.

| Carcass measurement                    | HPA                       | LPA                       |
|----------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Carcass width (cm)</b>              |                           |                           |
| Males                                  | 29.8 ± 0.92 <sup>a</sup>  | 26.14 ± 0.98 <sup>b</sup> |
| Females                                | 27.8 ± 0.92               | 30.11 ± 0.87              |
| <b>Buttock width (cm)</b>              |                           |                           |
| Males                                  | 26.4 ± 0.75               | 23.9 ± 0.79               |
| Females                                | 24.1 ± 0.75               | 23.9 ± 0.71               |
| <b>Carcass compactness</b>             |                           |                           |
| Males                                  | 0.32 ± 0.03 <sup>a</sup>  | 0.18 ± 0.04 <sup>b</sup>  |
| Females                                | 0.28 ± 0.03               | 0.26 ± 0.03               |
| <b>Chest roundness index</b>           |                           |                           |
| Males                                  | 1.13 ± 0.09               | 1.06 ± 0.10               |
| Females                                | 1.17 ± 0.10               | 1.15 ± 0.09               |
| <b>Buttock perimeter (cm)</b>          |                           |                           |
| Males                                  | 68.19 ± 1.11 <sup>a</sup> | 64.71 ± 1.18 <sup>b</sup> |
| Females                                | 65.50 ± 1.11              | 66.11 ± 1.04              |
| <b>Subcutaneous fat thickness (mm)</b> |                           |                           |
| Males                                  | 12.25 ± 1.53              | 11.86 ± 1.63              |
| Females                                | 14.38 ± 1.53              | 15.70 ± 1.37              |
| <b>Leg compactness</b>                 |                           |                           |
| Males                                  | 0.11 ± 0.005              | 0.10 ± 0.006              |
| Females                                | 0.10 ± 0.005              | 0.09 ± 0.005              |
| <b>Thoracic depth (cm)</b>             |                           |                           |
| Males                                  | 26.50 ± 0.72              | 24.82 ± 0.75              |
| Females                                | 23.87 ± 0.72              | 23.80 ± 0.66              |
| <b>Hindlimb length (cm)</b>            |                           |                           |
| Males                                  | 32.46 ± 0.90              | 30.29 ± 0.93              |
| Females                                | 31.18 ± 0.91              | 31.22 ± 0.84              |
| <b>Internal carcass length (cm)</b>    |                           |                           |
| Males                                  | 65.23 ± 0.99              | 62.46 ± 1.04              |
| Females                                | 61.97 ± 0.99              | 61.47 ± 0.89              |
| <b>Hot carcass weight (Kg)</b>         |                           |                           |
| Males                                  | 20.49 ± 1.04              | 17.86 ± 1.09              |
| Females                                | 18.16 ± 1.04              | 18.47 ± 0.95              |
| <b>Liver weight (g)</b>                |                           |                           |
| Males                                  | 733.1 ± 42.1              | 667.1 ± 45.0              |
| Females                                | 613.1 ± 42.1              | 585.5 ± 37.7              |
| <b>Heart weight (g)</b>                |                           |                           |
| Males                                  | 210.8 ± 8.7 <sup>a</sup>  | 185.4 ± 9.2 <sup>b</sup>  |
| Females                                | 178.0 ± 8.8               | 189.1 ± 7.9               |
| <b>Adrenal glands weight (g)</b>       |                           |                           |
| Males                                  | 2.15 ± 1.06               | 3.34 ± 1.13               |
| Females                                | 1.10 ± 1.06               | 1.68 ± 0.95               |
| <b>Kidneys weight (g)</b>              |                           |                           |
| Males                                  | 143.13 ± 6.39             | 129.86 ± 6.83             |
| Females                                | 113.63 ± 6.39             | 119.20 ± 5.72             |

Within the same row, those means followed by different superscripts differed (a vs b;  $P < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Our results demonstrate that reducing pasture allowance to pregnant ewes from gestation day 30 on affects growth performance, carcass and meat quality of lambs mostly in a sex-dependent manner. As expected, the applied nutritional treatments resulted in different BW and different serum biochemical profiles between HPA and LPA ewes throughout gestation. Interestingly, our results also show that pasture allowance differentially affected ewes BW depending on the sex of their gestating fetus. Undernourished ewes carrying male fetuses showed more moderate and delayed BW reductions than those carrying females. This is consistent with a female-offspring protection strategy triggered under restrictive nutritional conditions, which is known as an evolutionary mechanism for protecting those less energetic expensive fetuses, or those having greater chances of being reproductively successful (Trivers and Willard, 1973; Hewison and Gaillard, 1999). Therefore, in the present study undernourished ewes carrying more energy expensive (male) fetuses might have declined to invest in their sons in order to preserve their own condition, thus resulting in the generally greater effects detected over male than over female progeny throughout the

experiment. This is also consistent with our findings regarding the lactation period, in which ewes' milk production was also affected in a sex-dependent manner, with LPA ewes breeding male lambs producing less milk.

In the present study, consistently with previous research (Daniel et al., 2007; Sen et al., 2015) no treatment (sex-independent) effect was detected on lambs' weights or body measurements at birth. This could be related to the fact that, although in the present study the two different pasture allowances were maintained until birth, ewe supplementation during advanced pregnancy could have mitigated nutritional treatment effects in late pregnancy which is known to be the key period affecting birth weight (Kenyon and Blair, 2014). Nevertheless, our results indicate the existence of sex-dependent fetal programming effects on lambs' BW from birth until slaughtering; generally showing that maternal undernutrition affected the growth of male but not female offspring during both the lactation and fattening period. This could be related not only with our found sex-dependent effects over maternal milk production, but also with intrinsic sex differences in growth abilities. Better post-natal growth ability of females born to restricted mothers has been demonstrated in pigs as associated to advanced intestinal development and improved nutrient absorption (D'Inca et al., 2010; Gonzalez-Bulnes et al., 2012; Torres Rovira et al., 2013). Furthermore, liver development and hepatic gluconeogenesis have also been proposed as important mechanisms involved in this sex-related growth effects (Jia et al., 2012; Torres Rovira et al., 2013). In the present study mean food intake was reduced during the fattening period in male but not in female LPA lambs. However, we found no differences in feed conversion ratio between experimental groups. Furthermore, when feed intakes and mean daily gains were referred to each lamb's metabolic weight, no differences between experimental groups were detected, thus indicating that the effect was probably due to differences in animal sizes. Previous studies have evaluated fetal programming effects on growth efficiency of meat-producing animals. In cattle, much of the research has been focused on late pregnancy supplementation, generally showing no benefit of supplementation on postweaning performance (Stalker et al., 2006; Bohnert et al., 2013). However, similarly to our results, Underwood et al. (2010) reported that steers born to cows grazing lower quality pastures from mid to late gestation showed reduced daily weight gains. In sheep, maternal undernutrition during early to mid-gestation reduced lamb daily weight gains from weaning to slaughter (Nordby et al., 1987; Sen et al., 2015) not affecting feed intake or growth efficiency (Daniel et al., 2007). Therefore, our results are generally consistent with previous research carried out in cattle and sheep indicating that lambs born to undernourished ewes gain less weight, but show no differences in feed conversion ratio or food intake.

Maternal undernutrition during gestation affected carcass conformation and meat yield in a sex-dependent manner. Male LPA lambs showed reduced ultrasound muscle measurements as well as poorer quality carcasses, while no differences were detected in these traits between females. Although, assessing carcass quality through objective determinations has been described as essential for predicting saleable meat and carcass value (Jones et al., 1996), previous reports evaluating fetal programming effects on these traits in lambs are scarce. Recently, Piaggio et al. (2018) reported that gestational energy restriction followed by ad libitum re-feeding does not affect rib eye area, back fatness or carcass traits, while it reduces the weight and yield of the frenched rack cut. However, these authors assessed carcass quality by only measuring carcass and leg lengths and yields. Previously, Daniel et al. (2007) reported that maternal energy restriction reduced the width but not the depth of the *Longissimus* muscle, not affecting subcutaneous fat thickness. However, these authors did not perform objective carcass quality determinations. Moreover, although Nordby et al. (1987) reported that lambs born to undernourished ewes presented a lower proportion of dissected leg bone tissues, they did not perform objective carcass quality determinations either. Therefore, as far as we know, our present work is the first to report sex-dependent

Table 6

Individual traits for muscles *Gluteobiceps* and *Gluteus medius* of male, female and both pooled sexes lambs born to HPA and LPA ewes.

|                              | HPA<br>Pooled males and females | Males                     | Females                   | LPA<br>Pooled males and females | Males                     | Females                   |
|------------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b><i>Gluteobiceps</i></b>   |                                 |                           |                           |                                 |                           |                           |
| Weight (g)                   | 281.7 ± 10.6 <sup>a</sup>       | 312.2 ± 14.2 <sup>a</sup> | 251.2 ± 14.2              | 250.3 ± 10.5 <sup>b</sup>       | 247.2 ± 14.9 <sup>b</sup> | 253.3 ± 12.8              |
| L*                           | 34.39 ± 1.31                    | 36.65 ± 1.50              | 32.15 ± 1.51 <sup>b</sup> | 35.52 ± 1.30                    | 35.53 ± 1.54              | 35.50 ± 1.42 <sup>a</sup> |
| a*                           | 16.16 ± 0.63                    | 17.08 ± 0.89              | 15.23 ± 0.89              | 16.11 ± 0.62                    | 15.76 ± 0.95              | 16.47 ± 0.79              |
| b*                           | 10.16 ± 0.93                    | 11.37 ± 1.10              | 8.94 ± 1.10 <sup>c</sup>  | 10.41 ± 0.92                    | 10.26 ± 1.14              | 10.56 ± 1.03 <sup>c</sup> |
| H                            | 31.94 ± 1.96                    | 33.53 ± 2.23              | 30.35 ± 2.22              | 32.38 ± 1.95                    | 32.54 ± 2.29              | 32.24 ± 2.11              |
| C                            | 19.10 ± 0.84                    | 20.46 ± 1.16              | 17.74 ± 1.17              | 19.25 ± 0.83                    | 18.87 ± 1.24              | 19.63 ± 1.05              |
| ΔpH                          | 0.86 ± 0.13                     | 1.11 ± 0.17               | 0.61 ± 0.18               | 0.77 ± 0.13                     | 0.77 ± 0.18               | 0.76 ± 0.16               |
| pH                           | 6.45 ± 0.07                     | 6.49 ± 0.09               | 6.41 ± 0.09               | 6.40 ± 0.07                     | 6.38 ± 0.10               | 6.43 ± 0.09               |
| pH <sub>45</sub>             | 6.88 ± 0.09                     | 7.01 ± 0.13 <sup>a</sup>  | 6.70 ± 0.13               | 6.79 ± 0.09                     | 6.76 ± 0.13 <sup>b</sup>  | 6.81 ± 0.11               |
| pH <sub>24</sub>             | 6.02 ± 0.09                     | 5.93 ± 0.13               | 6.12 ± 0.13               | 6.02 ± 0.09                     | 5.99 ± 0.13               | 6.05 ± 0.12               |
| <b><i>Gluteus medius</i></b> |                                 |                           |                           |                                 |                           |                           |
| Weight (g)                   | 153.5 ± 6.75 <sup>a</sup>       | 173.9 ± 9.54 <sup>a</sup> | 133.2 ± 9.54              | 135.5 ± 6.65 <sup>b</sup>       | 137.1 ± 10.2 <sup>b</sup> | 133.8 ± 8.53              |
| L*                           | 34.80 ± 0.99                    | 36.63 ± 1.20              | 32.97 ± 1.21 <sup>b</sup> | 35.46 ± 0.99                    | 35.42 ± 1.24              | 35.50 ± 1.12 <sup>a</sup> |
| a*                           | 17.35 ± 0.75                    | 17.84 ± 1.06              | 16.86 ± 1.06              | 16.67 ± 0.74                    | 16.69 ± 1.14              | 16.66 ± 0.95              |
| b*                           | 10.34 ± 0.54                    | 11.14 ± 0.77              | 9.54 ± 0.77               | 10.57 ± 0.54                    | 10.59 ± 0.82              | 10.55 ± 0.69              |
| H                            | 30.71 ± 1.19                    | 32.19 ± 1.43              | 29.22 ± 1.57              | 32.49 ± 1.18                    | 32.89 ± 1.65              | 32.09 ± 1.43              |
| C                            | 20.21 ± 0.85                    | 21.04 ± 1.21              | 19.39 ± 1.21              | 19.81 ± 0.84                    | 1.81 ± 1.29               | 19.82 ± 1.08              |
| ΔpH                          | 0.70 ± 0.05                     | 0.67 ± 0.07               | 0.73 ± 0.07               | 0.71 ± 0.05                     | 0.74 ± 0.07               | 0.68 ± 0.06               |
| pH                           | 6.32 ± 0.03                     | 6.28 ± 0.05               | 6.37 ± 0.05               | 6.33 ± 0.03                     | 6.33 ± 0.05               | 6.33 ± 0.04               |
| pH <sub>45</sub>             | 6.67 ± 0.04                     | 6.61 ± 0.06               | 6.73 ± 0.06               | 6.68 ± 0.04                     | 6.70 ± 0.06               | 6.67 ± 0.05               |
| pH <sub>24</sub>             | 5.97 ± 0.04                     | 5.95 ± 0.06               | 5.99 ± 0.06               | 5.97 ± 0.04                     | 5.96 ± 0.06               | 5.99 ± 0.05               |

Within the same row (muscle trait) and the same sex (males, females or pooled males and females) those means followed by different superscripts were (a vs b) or tended (x vs y) to be different ( $P < 0.05$  or  $P < 0.1$ , respectively).

fetal programming effects on objectively measured lamb carcass quality. The observed differences in carcass quality suggest that maternal undernutrition could affect more severely males than females, and might be associated not only with differences in skeletal muscle development, but also with differences in bone development between HPA and LPA lambs. As a matter of fact, maternal undernutrition reduced femur weight, length and cortical bone density in five-month old lambs (Tygesen et al., 2007).

Moreover, the present study also indicates that maternal undernutrition might affect in a more profound way individual muscle weight and meat yield in males as compared with females. Reduced muscle weight was observed in muscles *Gluteobiceps* and *Semitendinosus* from LPA lambs with the effects persisting even when carcass weight was

included in the model as a covariate. These results disagree with Sen et al. (2015) who reported that maternal nutrient restriction reduced the absolute weight of muscles *Semitendinosus*, *Semimembranosus* and *Gastrocnemius*, but with all these effects disappearing when muscle weights are expressed as a percentage of carcass weight. Moreover, in the present study, sex-dependent muscle weight reduction was found for muscles *Gluteobiceps*, *Supraspinatus* and *Semitendinosus*, with most of these effects tending to persist even when carcass weight was included in the model as a covariate. This is consistent with Daniel et al. (2007) who reported a sex-dependent effect of maternal undernutrition on *Longissimus lumborum* and *Vastus lateralis* muscle weights. Maternal undernutrition is known to affect skeletal muscle development with the secondary fiber formation period (around 55–75 days of gestation in

Table 7

Individual traits for muscles *Infraspinatus* and *Supraspinatus* of male, female and both pooled sexes lambs born to HPA and LPA ewes.

|                             | HPA<br>Pooled males and females | Males                     | Females                   | LPA<br>Pooled males and females | Males                     | Females                   |
|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b><i>Infraspinatus</i></b> |                                 |                           |                           |                                 |                           |                           |
| Weight (g)                  | 121.2 ± 4.36 <sup>a</sup>       | 132.8 ± 6.17              | 109.7 ± 6.17              | 110.9 ± 4.29 <sup>b</sup>       | 114.5 ± 6.59              | 107.4 ± 5.51              |
| L*                          | 38.91 ± 0.79                    | 40.14 ± 1.12              | 37.69 ± 1.12              | 38.52 ± 0.78                    | 39.58 ± 1.20              | 37.47 ± 1.01              |
| a*                          | 15.10 ± 0.55                    | 15.04 ± 0.71              | 15.16 ± 0.72              | 15.25 ± 0.54                    | 14.95 ± 0.75              | 15.54 ± 0.65              |
| b*                          | 10.24 ± 0.33                    | 10.77 ± 0.44              | 9.70 ± 0.44               | 10.21 ± 0.33                    | 10.14 ± 0.48              | 10.28 ± 0.40              |
| H                           | 34.24 ± 1.16                    | 35.54 ± 1.39              | 32.94 ± 1.41              | 33.89 ± 1.15                    | 34.23 ± 1.45              | 33.57 ± 1.30              |
| C                           | 18.30 ± 0.48                    | 18.46 ± 0.69              | 18.14 ± 0.69              | 18.38 ± 0.48                    | 18.09 ± 0.74              | 18.68 ± 0.62              |
| ΔpH                         | 0.47 ± 0.06                     | 0.53 ± 0.08               | 0.40 ± 0.08               | 0.49 ± 0.06                     | 0.56 ± 0.09               | 0.43 ± 0.07               |
| pH                          | 6.49 ± 0.04                     | 6.42 ± 0.06               | 6.58 ± 0.06               | 6.47 ± 0.04                     | 6.45 ± 0.07               | 6.49 ± 0.06               |
| pH <sub>45</sub>            | 6.73 ± 0.05                     | 6.68 ± 0.07               | 6.77 ± 0.07               | 6.72 ± 0.05                     | 6.73 ± 0.08               | 6.71 ± 0.07               |
| pH <sub>24</sub>            | 6.26 ± 0.05                     | 6.15 ± 0.07               | 6.38 ± 0.07               | 6.23 ± 0.05                     | 6.17 ± 0.08               | 6.28 ± 0.07               |
| <b><i>Supraspinatus</i></b> |                                 |                           |                           |                                 |                           |                           |
| Weight (g)                  | 120.1 ± 5.05 <sup>a</sup>       | 132.7 ± 6.75 <sup>a</sup> | 107.5 ± 6.78              | 108.8 ± 4.99 <sup>b</sup>       | 105.9 ± 7.13 <sup>b</sup> | 111.7 ± 6.10              |
| L*                          | 38.39 ± 1.37                    | 41.21 ± 1.63              | 35.56 ± 1.64              | 38.68 ± 1.36                    | 39.97 ± 1.69              | 37.39 ± 1.52              |
| a*                          | 18.75 ± 0.83                    | 18.20 ± 1.19              | 19.30 ± 1.19              | 18.21 ± 0.83                    | 18.32 ± 1.27              | 18.11 ± 1.06              |
| b*                          | 12.64 ± 0.64                    | 14.08 ± 0.78              | 11.21 ± 0.78              | 12.17 ± 0.63                    | 12.74 ± 0.80              | 11.60 ± 0.72              |
| H                           | 34.17 ± 1.76                    | 37.87 ± 1.96              | 30.47 ± 1.97 <sup>b</sup> | 34.18 ± 1.76                    | 35.28 ± 1.88              | 33.08 ± 2.04 <sup>a</sup> |
| C                           | 22.63 ± 1.14                    | 23.09 ± 1.43              | 22.16 ± 1.44              | 21.89 ± 1.14                    | 22.22 ± 1.50              | 21.56 ± 1.32              |
| ΔpH                         | 0.48 ± 0.07                     | 0.56 ± 0.09               | 0.40 ± 0.09               | 0.35 ± 0.07                     | 0.32 ± 0.09               | 0.38 ± 0.09               |
| pH                          | 6.41 ± 0.04                     | 6.36 ± 0.06               | 6.47 ± 0.06               | 6.41 ± 0.04                     | 6.39 ± 0.07               | 6.43 ± 0.06               |
| pH <sub>45</sub>            | 6.65 ± 0.05                     | 6.63 ± 0.08               | 6.67 ± 0.08               | 6.59 ± 0.05                     | 6.55 ± 0.08               | 6.62 ± 0.07               |
| pH <sub>24</sub>            | 6.17 ± 0.05                     | 6.08 ± 0.08               | 6.27 ± 0.08               | 6.24 ± 0.05                     | 6.24 ± 0.08               | 6.24 ± 0.07               |

Within the same row (muscle trait) and the same sex (males, females or pooled males and females) those means followed by different superscripts were (a vs b) or tended (x vs y) to be different ( $P < 0.05$  or  $P < 0.1$ , respectively).

**Table 8**  
Individual traits for muscle *Longissimus lumborum* and *Psoas major* of male, female and both pooled sexes lambs born to HPA and LPA ewes.

|                                    | HPA<br>Pooled males and females | Males                     | Females                   | LPA<br>Pooled males and females | Males                     | Females                   |
|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b><i>Longissimus lumborum</i></b> |                                 |                           |                           |                                 |                           |                           |
| Weight (g)                         | 228.6 ± 13.2                    | 253.7 ± 18.7              | 203.5 ± 18.7              | 209.9 ± 13.3                    | 209.4 ± 20.0              | 210.4 ± 17.7              |
| L*                                 | 33.86 ± 6.52                    | 34.93 ± 9.22              | 32.80 ± 9.22              | 42.11 ± 6.42                    | 35.69 ± 9.86              | 48.54 ± 8.25              |
| a*                                 | 14.72 ± 0.59                    | 15.16 ± 0.76              | 14.27 ± 0.77              | 14.85 ± 0.59                    | 14.77 ± 0.80              | 14.93 ± 0.70              |
| b*                                 | 8.79 ± 0.31                     | 9.26 ± 0.39               | 8.31 ± 0.39               | 9.15 ± 0.30                     | 9.22 ± 0.42               | 9.08 ± 0.36               |
| H                                  | 30.89 ± 0.59                    | 31.63 ± 0.83              | 30.15 ± 0.83              | 31.77 ± 0.58                    | 32.24 ± 0.89              | 31.30 ± 0.74              |
| C                                  | 17.16 ± 0.70                    | 17.78 ± 0.86              | 16.54 ± 0.87              | 17.45 ± 0.69                    | 17.42 ± 0.90              | 17.49 ± 0.80              |
| ΔpH                                | 0.54 ± 0.06 <sup>b</sup>        | 0.47 ± 0.07 <sup>b</sup>  | 0.60 ± 0.07               | 0.66 ± 0.06 <sup>a</sup>        | 0.72 ± 0.07 <sup>a</sup>  | 0.59 ± 0.06               |
| pH                                 | 6.24 ± 0.04                     | 6.17 ± 0.05 <sup>b</sup>  | 6.32 ± 0.05               | 6.29 ± 0.04                     | 6.32 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 6.27 ± 0.04               |
| pH <sub>45</sub>                   | 6.51 ± 0.05 <sup>a</sup>        | 6.41 ± 0.06 <sup>b</sup>  | 6.61 ± 0.06               | 6.62 ± 0.04 <sup>b</sup>        | 6.74 ± 0.04 <sup>a</sup>  | 6.56 ± 0.05               |
| pH <sub>24</sub>                   | 5.98 ± 0.04                     | 5.93 ± 0.06               | 6.03 ± 0.06               | 5.96 ± 0.04                     | 5.97 ± 0.04               | 5.97 ± 0.05               |
| <b><i>Psoas major</i></b>          |                                 |                           |                           |                                 |                           |                           |
| Weight (g)                         | 92.19 ± 4.63                    | 97.79 ± 6.55              | 86.60 ± 6.54              | 82.11 ± 4.66                    | 87.29 ± 6.99              | 76.94 ± 6.17              |
| L*                                 | 37.99 ± 0.56                    | 39.77 ± 0.77              | 36.22 ± 0.77 <sup>f</sup> | 39.23 ± 0.55                    | 39.64 ± 0.82              | 38.82 ± 0.69 <sup>a</sup> |
| a*                                 | 19.53 ± 0.94 <sup>a</sup>       | 19.55 ± 1.26              | 19.50 ± 1.17              | 17.07 ± 0.93 <sup>b</sup>       | 17.18 ± 1.21              | 16.96 ± 1.08              |
| b*                                 | 12.20 ± 0.65 <sup>a</sup>       | 13.49 ± 0.89              | 10.91 ± 0.83              | 10.49 ± 0.65 <sup>b</sup>       | 10.81 ± 0.86              | 10.17 ± 0.76              |
| H                                  | 32.04 ± 1.02                    | 34.86 ± 1.40 <sup>a</sup> | 29.22 ± 1.31              | 31.41 ± 1.00                    | 32.06 ± 1.35 <sup>a</sup> | 30.75 ± 1.19              |
| C                                  | 22.86 ± 1.18 <sup>a</sup>       | 23.14 ± 1.43              | 22.57 ± 1.43              | 20.28 ± 1.17 <sup>b</sup>       | 20.52 ± 1.47              | 20.04 ± 1.33              |
| ΔpH                                | 0.18 ± 0.06                     | 0.10 ± 0.08               | 0.25 ± 0.08               | 0.14 ± 0.06                     | 0.16 ± 0.09               | 0.12 ± 0.08               |
| pH                                 | 6.19 ± 0.05                     | 6.02 ± 0.07               | 6.35 ± 0.07               | 6.08 ± 0.05                     | 6.02 ± 0.07               | 6.13 ± 0.06               |
| pH <sub>45</sub>                   | 6.28 ± 0.06                     | 6.07 ± 0.08               | 6.48 ± 0.08               | 6.15 ± 0.06                     | 6.10 ± 0.09               | 6.19 ± 0.07               |
| pH <sub>24</sub>                   | 6.09 ± 0.06                     | 5.97 ± 0.08               | 6.23 ± 0.08               | 6.01 ± 0.06                     | 5.94 ± 0.09               | 6.07 ± 0.07               |

Within the same row (muscle trait) and the same sex (males, females or pooled males and females) those means followed by different superscripts were (a vs b) or tended (x vs y) to be different ( $P < 0.05$  or  $P < 0.1$ , respectively).

sheep) being especially critical for future muscle mass (Picard et al., 2002). Therefore, our results might be associated with a reduction in secondary fiber formation in LPA lambs. In fact, maternal undernutrition reduced the number of secondary fibers in 70-day old sheep fetuses (Zhu et al., 2004). Moreover, differences in treatment response between muscles could be associated with intermuscular differences in the timing of development (Rehfeldt et al., 2011) as well as with differences in fiber type compositions which result in different levels of susceptibility to maternal undernutrition (Ward and Stickland 1991).

Our results also indicate that maternal undernutrition affects meat quality in a sex-dependent manner. The clearest effect of maternal undernutrition was generally represented by an increase in meat lightness in most muscles from female but not male lambs. Meat color is

one of the main quality attributes since it influences meat purchasing decisions more than any other meat quality characteristic (Mancini and Hunt, 2005). One of the key factors influencing meat color is muscle fiber composition with higher proportions of larger fast-glycolytic fibers being associated with increased meat lightness in most lamb muscles (Ithurralde et al., 2017). Therefore, our findings could be associated with differences in muscle fiber compositions due to maternal undernutrition. Although sex-dependent effects on meat color might be difficult to explain, previous information indicates that maternal undernutrition could impact on muscle fiber typing in a sex-dependent manner. Maternal undernutrition increased the proportion of IIA and IIB fibers in the *Semitenidinosus* of female lambs, while it only increased the proportion of IIB fibers in male lambs (Daniel et al., 2007).

**Table 9**  
Individual traits for muscles *Semitenidinosus* and *Semimembranosus* of male, female and both pooled sexes lambs born to HPA and LPA ewes.

|                               | HPA<br>Pooled males and females | Males                     | Females                   | LPA<br>Pooled males and females | Males                     | Females                   |
|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b><i>Semitenidinosus</i></b> |                                 |                           |                           |                                 |                           |                           |
| Weight (g)                    | 99.5 ± 3.23 <sup>a</sup>        | 109.7 ± 4.57 <sup>a</sup> | 89.3 ± 4.57               | 87.9 ± 3.18 <sup>b</sup>        | 86.5 ± 4.88 <sup>b</sup>  | 89.4 ± 4.09               |
| L*                            | 41.09 ± 0.88                    | 42.12 ± 1.12              | 40.06 ± 1.12              | 41.72 ± 0.87                    | 42.77 ± 1.17              | 40.67 ± 1.02              |
| a*                            | 14.52 ± 0.68                    | 13.76 ± 0.92              | 15.28 ± 0.92              | 13.89 ± 0.67                    | 13.01 ± 0.97              | 14.79 ± 0.93              |
| b*                            | 11.13 ± 0.51                    | 11.43 ± 0.68              | 10.82 ± 0.69              | 11.16 ± 0.51                    | 10.48 ± 0.73              | 11.84 ± 0.62              |
| H                             | 37.73 ± 1.06                    | 40.19 ± 1.45              | 35.27 ± 1.46 <sup>f</sup> | 38.77 ± 1.05                    | 38.86 ± 1.54              | 38.68 ± 1.31 <sup>a</sup> |
| C                             | 18.37 ± 0.70                    | 17.88 ± 1.00              | 18.86 ± 1.00              | 17.87 ± 0.69                    | 16.76 ± 1.07              | 18.99 ± 0.89              |
| ΔpH                           | 0.39 ± 0.06                     | 0.31 ± 0.08               | 0.49 ± 0.09               | 0.40 ± 0.06                     | 0.36 ± 0.09               | 0.44 ± 0.08               |
| pH                            | 6.17 ± 0.04                     | 6.11 ± 0.06               | 6.24 ± 0.06               | 6.20 ± 0.04                     | 6.21 ± 0.06               | 6.19 ± 0.05               |
| pH <sub>45</sub>              | 6.37 ± 0.05                     | 6.27 ± 0.07               | 6.48 ± 0.07               | 6.40 ± 0.05                     | 6.39 ± 0.08               | 6.41 ± 0.07               |
| pH <sub>24</sub>              | 5.97 ± 0.05                     | 5.95 ± 0.07               | 5.99 ± 0.07               | 6.00 ± 0.05                     | 6.03 ± 0.08               | 5.97 ± 0.07               |
| <b><i>Semimembranosus</i></b> |                                 |                           |                           |                                 |                           |                           |
| Weight (g)                    | 253.4 ± 11.3                    | 274.6 ± 15.4 <sup>a</sup> | 232.2 ± 15.4              | 237.9 ± 11.1                    | 233.4 ± 16.3 <sup>f</sup> | 242.5 ± 13.9              |
| L*                            | 33.09 ± 0.68                    | 35.69 ± 0.87              | 30.49 ± 0.87 <sup>f</sup> | 33.85 ± 0.68                    | 35.08 ± 0.91              | 32.63 ± 0.79 <sup>a</sup> |
| a*                            | 15.88 ± 1.42 <sup>a</sup>       | 17.11 ± 1.54              | 14.63 ± 1.55              | 14.28 ± 1.42 <sup>f</sup>       | 14.75 ± 1.58              | 13.82 ± 1.49              |
| b*                            | 8.91 ± 0.93                     | 10.07 ± 1.06              | 7.75 ± 1.07               | 8.41 ± 0.93                     | 8.55 ± 1.09               | 8.26 ± 1.01               |
| H                             | 29.01 ± 1.52                    | 30.28 ± 1.86              | 27.73 ± 1.87              | 30.15 ± 1.51                    | 29.27 ± 1.93              | 31.02 ± 1.72              |
| C                             | 18.22 ± 1.65                    | 19.83 ± 1.81              | 16.63 ± 1.82              | 16.63 ± 1.65                    | 17.08 ± 1.85              | 16.17 ± 1.74              |
| ΔpH                           | 0.86 ± 0.13                     | 1.11 ± 0.17               | 0.61 ± 0.18               | 0.77 ± 0.13                     | 0.77 ± 0.18               | 0.76 ± 0.16               |
| pH                            | 6.34 ± 0.02                     | 6.29 ± 0.03               | 6.38 ± 0.03               | 6.36 ± 0.02                     | 6.35 ± 0.03               | 6.38 ± 0.03               |
| pH <sub>45</sub>              | 6.72 ± 0.03                     | 6.70 ± 0.04               | 6.73 ± 0.04               | 6.76 ± 0.03                     | 6.74 ± 0.04               | 6.78 ± 0.03               |
| pH <sub>24</sub>              | 5.96 ± 0.03                     | 5.88 ± 0.04 <sup>f</sup>  | 6.04 ± 0.04               | 5.97 ± 0.03                     | 5.97 ± 0.04 <sup>a</sup>  | 5.98 ± 0.03               |

Within the same row (muscle trait) and the same sex (males, females or pooled males and females) those means followed by different superscripts were (a vs b) or tended (x vs y) to be different ( $P < 0.05$  or  $P < 0.1$ , respectively).

Moreover, the mean diameter of slow muscle fibers was reduced in the *Longissimus* muscle of female but not male lambs born to undernourished ewes (Daniel et al., 2007). All these findings might indicate that muscles from female lambs born to restricted ewes become generally faster and more glycolytic, which is consistent with our present findings regarding meat color. In fact, increased L\* found in muscles *Gluteobiceps*, *Gluteus medius*, *Psoas major* and *Semimembranosus* from LPA female lambs, increased b\* found in the *Gluteobiceps* of LPA female lambs, increased h\* found in the *Supraspinatus* and in the *Semitendinosus* from LPA females, and reduced a\* found in the *Semimembranosus* from LPA females and in the *Psoas major* of all LPA lambs, can all be generally associated with increased muscle glycolytic activity. Moreover, this treatment effect on meat color might also be associated with changes in intramuscular fat content, since visual appraisal of meat color and especially meat lightness are related to muscular marbling (Fiems et al., 2000). Sex-dependent fetal programming effects have been reported for individual muscle fat contents in lambs (Daniel et al., 2007). On the other hand, in the present work, meat pH seemed to be mostly affected in male but not in female lambs, with LPA lambs generally showing higher pH values. These findings could again be associated with intrinsic muscle changes such as fiber types, glycolytic potential or buffering capacity. However, since smaller muscles experiencing faster cooling rates are known to show slower pH decline rates and higher pH values (Bruce and Ball, 1990), sex-dependent effect in muscle pH might also be related to differences in muscle mass, which indeed was clearly more affected in male than in female lambs.

## 5. Conclusion

In conclusion, a reduced forage allowance offered to pregnant ewes from day 30 of gestation until lambing affected growth performance, carcass characteristics and meat quality of lambs mostly in a sex-dependent manner. Generally, male lambs born to undernourished ewes grew more slowly and showed poorer quality carcasses and reduced meat yields. Although female lambs born to undernourished ewes seemed to be less affected in terms of growth performance and carcass quality, they seemed to be more affected in terms of meat color.

## Conflict of interest

We confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

## Acknowledgments

The authors acknowledge Ing. Agr. Carlos Mantero, Director of the "Estación Experimental Bernardo Rosengurt" for his support, and Ing. Agr. María José Abud, Ignacio Sosa and Nicolás Zunino for their help with pasture and animal management during the experimental work. We also thank authorities of the Instituto Nacional de Carnes (INAC, Uruguay) who generously allowed use of their mobile slaughterhouse (Unidad de Faena Móvil), and Arch. Javier Díaz, Diego Petrone, Dr. Patricia Genovese, María Belén López, Sebastián Montaldo and Estefanía Marín for their help during animal slaughtering and sampling. We also thank Juan Iturralde for his contribution to improving the English language quality of this manuscript. This study was partially supported by research project CSIC-Iniciación/2017 awarded to J. Iturralde.

## References

- Bohnert, D.W., Stalker, L.A., Mills, R.R., Nyman, A., Falck, S.J., Cooke, R.F., 2013. Late gestation supplementation of beef cows differing in BCS: effects on cow and calf performance. *J. Anim. Sci.* 91, 5485–5491.
- Bruce, H.L., Ball, R.O., 1990. Postmortem interactions of muscle temperature, pH and extension on beef quality. *J. Anim. Sci.* 68, 4167–4175.
- Cañique, V., Pérez, C., Velasco, S., Díaz, M.T., Lauzurica, S., Álvarez, I., Ruiz de Huidobro, F., Onega, E., De la Fuente, J., 2004. Carcass and meat quality of light lambs using principal component analysis. *Meat Sci.* 67, 595–605.
- Caton, J.S., Hess, B.W., 2010. Maternal plane of nutrition: impacts on fetal outcomes and postnatal offspring responses. In: Hess, B.W., Delcurio, T., Bowman, J.G.P., Waterman, R.C. (Eds.), *Grazing Livestock Nutrition. Proceedings of the Western Section. American Society of Animal Science*, Champaign, IL, USA, pp. 104–122.
- Close, W.H., Pettigrew, J.E., 1990. Mathematical models of sow reproduction. *J. Reprod. Fert.* 40, 83–88.
- Daniel, Z.C., Brameld, J.M., Craigon, J., Scollan, N.D., Buttery, P.J., 2007. Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on lamb carcass characteristics and muscle fiber composition. *J. Anim. Sci.* 85, 1565–1576.
- Desai, M., Hales, C.N., 1997. Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biol. Rev.* 72, 329–348.
- D'Inca, R., Kloareg, M., Gras Le Guen, C., Le Huerou-Luron, I., 2010. Intrauterine growth restriction modifies the developmental pattern of intestinal structure, transcriptomic profile, and bacterial colonization in neonatal pigs. *J. Nutr.* 140, 925–931.
- Fiems, L.O., De Campeneere, S., De Smet, S., Van de Voorde, G., Vanacker, J.M., Boucqué, C.V., 2000. Relationship between fat depots in carcasses of beef bulls and effect on meat colour and tenderness. *Meat Sci.* 56, 41–47.
- Freitas de Melo, A., Ungerfeld, R., Hötzel, M.J., Orihuela, A., Pérez-Clariget, R., 2018. Influence of low pasture allowance during pregnancy on the attachment between ewes and their lambs at birth and during lactation. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 199, 9–16.
- Freitas de Melo, A., Ungerfeld, R., Hötzel, M.J., Abud, M.J., Alvarez-Oxley, A., Orihuela, A., Damián, J.P., Pérez-Clariget, R., 2015. Mother-young behaviours at lambing in grazing ewes: effects of lamb sex and food restriction in pregnancy. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 168, 31–36.
- 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.
- Gonzalez Buñes, A., Torres Rovira, L., Ovilo, C., Astiz, S., Gomez Izquierdo, E., Gonzalez-Anover, P., Pallares, P., Perez-Solana, M.L., Sanchez-Sanchez, R., 2012. Reproductive, endocrine and metabolic fetal-maternal features and placental gene expression in a swine breed with obesity/leptin resistance. *Gen. Comp. Endocrinol.* 176, 94–101.
- Gootwine, E., 2013. Meta-analysis of morphometric parameters of late-gestation fetal sheep developed under natural and artificial constraints. *J. Anim. Sci.* 91 (1), 111–119.
- Grigore, D., Ojeda, N.B., Alexander, B.T., 2008. Sex differences in the fetal programming of hypertension. *Gen. Med.* 5 (A), S121–S132.
- Haydock, K.P., Shaw, N.H., 1975. The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. *Aust. J. Exp. Agr.* 15 (76), 663–670.
- Hewison, A.J.M., Gaillard, J.M., 1999. Successful sons or advantaged daughters? The Trivers-Willard model and sex-biased maternal investment in ungulates. *Trends Ecol. Evol.* 14, 229–234.
- Iturralde, J., Bianchi, G., Feed, O., Nan, F., Ballesteros, F., Garibotto, G., Bielli, A., 2017. Variation in instrumental meat quality among 15 muscles from 14-month-old sheep and its relationship with fibre typing. *Anim. Prod. Sci.* 58 (7), 1358–1365.
- Jefferies, B.C., 1961. Body condition scoring and its use in management. *Tasman. J. Agric.* 32, 19–21.
- Jia, Y., Cong, R., Li, R., Yang, X., Sun, Q., Parvizi, N., Zhao, R., 2012. Maternal low-protein diet induces gender-dependent changes in epigenetic regulation of the glucose-6-phosphatase gene in newborn piglet liver. *J. Nutr.* 142, 1659–1665.
- Jones, S.D.M., Robertson, W.M., Price, M.A., Coupland, T., 1996. The prediction of saleable meat yield in lamb carcasses. *Can. J. Anim. Sci.* 76, 49–53.
- Kenyon, P.R., Blair, H.T., 2014. Foetal programming in sheep – effects on production. *Small Rumin. Res.* 118, 16–30.
- Koong, L.J., Garrett, W.N., Rattray, P.V., 1975. A description of the dynamics of fetal growth in sheep. *J. Anim. Sci.* 41, 1065–1068.
- Lee, S., Rivier, C., 1996. Gender differences in the effect of prenatal alcohol exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to immune signals. *Psychoneuroendocrinology* 21, 145–155.
- Mancini, R.A., Hunt, M.C., 2005. Current research in meat colour. *Meat Sci.* 71 (1), 100–121.
- McCormick, C.M., Smythe, J.W., Sharma, S., Meaney, M.J., 1995. Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. *Dev. Brain. Res.* 84, 55–61.
- Moritz, K.M., Cuffe, J.S.M., Wilson, L.B., Dickinson, H., Wlodek, M.E., Simmons, D.G., Denton, K.M., 2010. Review: sex specific programming: a critical role for the renal renin-angiotensin system. *Placenta* 31, 40–46.
- Muralimoharan, S., Li, C., Nakayasu, E.S., Casey, C.P., Metz, T.O., Nathaniel, P.W., Malayan, A., 2017. Sexual dimorphism in the fetal cardiac response to maternal nutrient restriction. *J. Mol. Cell Biol.* 108, 181–193.
- Nordby, D.J., Field, R.A., Riley, M.L., Kercher, C.J., 1987. Effects of maternal under-nutrition during early pregnancy on growth, muscle cellularity, fiber type and carcass composition in lambs. *J. Anim. Sci.* 64, 1419–1427.
- Piaggio, L., Quintans, G., San Julián, R., Ferreira, G., Iturralde, J., Fierro, S., Pereira, A.S.C., Baldi, S., Banchero, G., 2018. Growth, meat and feed efficiency traits of lambs born to ewes submitted to energy restriction during mid-gestation. *Animal* 12 (2), 256–264.
- Picard, B., Lefaucheur, L., Berri, C., Duclos, M., 2002. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reprod. Nutr. Dev.* 42 (5), 415–431.
- Rae, M.T., Kyle, C.E., Miller, D.W., Hammond, A.J., Brooks, A.N., Rhind, S.M., 2002. The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female

- sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 72 (1,2), 63–71.
- Rehfeldt, C., Te Pas, M.F.W., Wimmers, K., Brameld, J.M., Nissen, P.M., Berri, C., Valente, L.M.P., Power, D.M., Picard, B., Stickland, N.C., Okabjerg, N., 2011. Advances in research on the prenatal development of skeletal muscle in animals in relation to the quality of muscle-based food. I. Regulation of myogenesis and environmental impact. *Animal* 5 (5), 703–717.
- Sen, U., Sirin, E., Ensoy, U., Aksoy, Y., Ulutas, Z., Kuran, M., 2015. The effect of maternal nutrition level during mid-gestation on postnatal muscle fibre composition and meat quality in lambs. *Anim. Prod. Sci.* 56, 834–843.
- Stalker, L.A., Adams, D.C., Klopfenstein, T.J., Feuz, D.M., Funston, R.N., 2006. Effects of pre- and postpartum nutrition on reproduction in spring calving cows and calf feedlot performance. *J. Anim. Sci.* 84, 2582–2589.
- Torres Rovira, L., Tarrade, A., Astiz, S., Mourier, E., Perez Solana, M., De la Cruz, P., Gomez Fidalgo, E., SanchezSanchez, R., Chavatte Palmer, P., Gonzalez Bulnes, A., 2013. Sex and breed-dependent organ development and metabolic responses in fetuses from lean and obese/leptin resistant swine. *PLoSOne* 8 (7), e66728.
- Trivers, R.L., Willard, D.E., 1973. Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring. *Science* 1 (79), 90–92.
- Tygesen, M.P., Harrison, A.P., Therkildsen, M., 2007. The effect of maternal nutrition restriction during late gestation on muscle, bone and meat parameters in five month old lambs. *Livest. Sci.* 110, 230–241.
- Underwood, K.R., Tong, J.F., Price, P.L., Roberts, A.J., Grings, E.E., Hess, B.W., Means, W.J., Du, M., 2010. Nutrition during mid to late gestation affects growth, adipose tissue deposition, and tenderness in cross-bred beef steers. *Meat Sci.* 86, 588–593.
- Velasco, S., Lauzurica, S., Caneque, V., Pérez, C., Huidobro, F., Manzanares, C., Díaz, M.T., 2000. Carcass and meat quality of Talaverana breed suckling lambs in relation to gender and slaughter weight. *Anim. Sci.* 70, 253–263.
- Vergara, H., Molina, A., Gallego, L., 1999. Influence of sex and slaughter weight on carcass and meat quality in light and medium weight lambs produced in intensive systems. *Meat Sci.* 52, 221–226.
- Ward, S.S., Stickland, N.C., 1991. Why are slow and fast muscles differentially affected during prenatal undernutrition? *Muscle Nerve* 14 (3), 259–267.
- Wu, G., Bazer, F.W., Wallace, J.M., Spencer, T.E., 2006. Intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences. *J. Anim. Sci.* 84, 2316–2337.
- Zhu, M.J., Ford, S.P., Nathanielsz, P.W., Du, M., 2004. Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biol. Reprod.* 71, 1968–1973.

**5. EFECTO DE UNA MENOR OFERTA DE FORRAJE DE CAMPO NATURAL DURANTE LA GESTACIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS MUSCULARES Y LA CALIDAD DE LA CARNE DE CORDEROS PESADOS**

GESTATIONAL NUTRIENT RESTRICTION UNDER EXTENSIVE GRAZING CONDITIONS: EFFECTS ON MUSCLE CHARACTERISTICS AND MEAT QUALITY IN HEAVY LAMBS. 2021. Javier Ithurrealde, Raquel Pérez-Clariget, Ali Saadoun, Patricia Genovese, Cristina Cabrera, Yésica López, Oscar Feed y Alejandro Bielli. Este artículo fue publicado en la revista *Meat Science*.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de una subnutrición inducida mediante una menor oferta de forraje de campo natural desde el día 30 hasta el día 143 de gestación sobre las características histológicas fibrilares, así como las características bioquímicas y de calidad de carne en músculos de corderos pesados machos y hembras de 200 días de vida. El trabajo está enmarcado en lo que fue el experimento número 2 de la tesis, cuya etapa de campo se realizó en dos fases: una primera etapa de tratamiento de ovejas gestantes y cría de los corderos hasta el destete realizada en la Estación Experimental Bernardo Rosengurt de la Facultad de Agronomía (Udelar), Uruguay (32° S, 54° W) entre marzo y diciembre de 2016 y una segunda etapa de confinamiento y engorde de los corderos hasta la faena realizada en la Estación de Pruebas de la Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay, entre diciembre de 2016 y abril de 2017. Brevemente, el experimento consistió en someter a dos grupos de ovejas a dos ofertas de forraje de campo natural contrastantes [alta oferta = 14 a 20 kg MS/100 kg de PC por día; n = 16 (8 gestantes de machos y 8 gestantes de hembras) y baja oferta = 5 a 10 kg MS/100 kg de PC por día; n = 17 (7 gestantes de machos y 10 gestantes de hembras)] entre los días 30 y 143 de gestación. Desde el día 143 hasta el destete (90 días) las ovejas pastorearon sin restricciones en campo natural y fueron suplementadas colectivamente con afrechillo de arroz. Luego del destete, los corderos fueron alojados en corrales individuales y alimentados *ad libitum* hasta los 200 días de vida, momento en el que fueron faenados y muestreados. Se evaluaron las características fibrilares, la longitud del sarcómero, el contenido de glucógeno y lactato, el contenido de lípidos, las pérdidas por cocción y la terneza instrumental (fuerza de corte WB) en los músculos

*semitendinosus*, *gluteobiceps* y *supraspinatus*. Los resultados obtenidos demostraron que una subnutrición inducida por una menor oferta de forraje de campo natural produjo un marcado efecto sobre la composición fibrilar en los músculos de corderos de 200 días de vida, reduciendo la presencia de fibras glicolíticas y aumentando la actividad oxidativa en todos los músculos estudiados. A su vez, los resultados indican que algunos cambios fibrilares inducidos por la subnutrición prenatal podrían depender del sexo del animal y que estos cambios estarían relacionados con la alteración en los diámetros de los distintos tipos de fibras. La subnutrición materna redujo el diámetro de las fibras glicolíticas en el *gluteobiceps* de las hembras, exclusivamente, y redujo el diámetro de las fibras oxidativas solamente en el *supraspinatus* de los machos. Por otra parte, los resultados también indican la existencia de efectos de programación fetal sobre las características bioquímicas, de composición muscular y de calidad de carne, aunque la mayoría de estos efectos parecen depender tanto del músculo como del sexo del animal. La subnutrición materna aumentó el contenido lipídico solo en el *supraspinatus* de las hembras, redujo el contenido de lactato y la fuerza de corte WB solo en el *semitendinosus* de las hembras y aumentó las pérdidas por cocción solo en el *semitendinosus* de los machos. En síntesis, los resultados del trabajo indican que una subnutrición inducida por una menor oferta de campo natural entre el día 30 y 143 de gestación induce efectos de programación fetal evidenciables en animales de 200 días de vida. Esto implica que, independientemente de las condiciones posnatales, las alteraciones acontecidas durante la vida intrauterina de los corderos se traducen en cambios en las características histofisiológicas musculares, las cuales pueden estar relacionadas con la habilidad de los animales para crecer, así como también con la calidad de la carne producida. Asimismo, los resultados de este trabajo destacan la importancia que tiene considerar tanto el sexo del animal como el músculo a la hora de estudiar estos efectos.



## Gestational nutrient restriction under extensive grazing conditions: Effects on muscle characteristics and meat quality in heavy lambs

J. Ithurralde<sup>a,\*</sup>, R. Pérez-Clariget<sup>a</sup>, A. Saadoun<sup>a</sup>, P. Genovese<sup>b</sup>, C. Cabrera<sup>a</sup>, Y. López<sup>c</sup>, O. Feed<sup>c</sup>, A. Bielli<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Garzón 780, 12900 Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup> Departamento de Morfología y Desarrollo, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, A. Las Plazas 1550, 11600 Montevideo, Uruguay

<sup>c</sup> Research Station 'Dr Mario A. Cassinoni' (EEMAC) Facultad de Agronomía, Route 3, km 363, Paysandú, Uruguay

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Fetal programming  
Sheep  
Fiber types  
Meat quality

### ABSTRACT

We evaluated maternal undernutrition effects induced by a lower natural pasture allowance (gestation days 30–143) on histological-biochemical and meat traits in muscles *Semitendinosus*, cranial *Gluteobiceps* and *Supraspinatus* from 200-day old male and female lambs. Maternal undernutrition increased oxidative and reduced glycolytic fibers in all muscles ( $P < 0.01$ ). Maternal undernutrition reduced the diameter of glycolytic fibers in the cranial *Gluteobiceps* of exclusively female lambs ( $P = 0.05$ ) and reduced the diameter of oxidative fibers in the *Supraspinatus* of exclusively male lambs ( $P = 0.02$ ). Maternal undernutrition increased lipid content in the *Supraspinatus* of females ( $P = 0.001$ ), reduced lactate content ( $P = 0.03$ ) and WB shear force ( $P = 0.02$ ) in the *Semitendinosus* of females, and increased cooking losses in the *Semitendinosus* of males ( $P = 0.0069$ ). In conclusion, gestational nutrient restriction induced fetal programming effects on muscle characteristics of lambs. Moreover, our study demonstrates that maternal undernutrition influences muscle and meat characteristics in a sex and muscle-dependent way.

### 1. Introduction

In temperate countries where ruminants are managed under extensive conditions, the seasonal variation in pasture quality and quantity can be an important limiting factor for meat production. Natural forage deficiency can be a common occurrence especially during winter, leading gestating sheep to nutrient restriction thus compromising offspring performance (Du, Wang, Fu, Yang, & Zhu, 2015). Skeletal muscle is especially labile to maternal undernutrition because of its low priority in nutrient partitioning (Close & Pettigrew, 1990). Furthermore, the fetal stage is crucial for meat quality since this is a key stage for the development of both muscle and non muscle tissues comprising meat pieces (Du et al., 2015; Picard, Lefaucheur, Berri, & Duclos, 2002).

Previous studies regarding maternal undernutrition effects on heavy lamb muscle characteristics have reported inconsistent results. According to both Zhu et al. (2006) and Daniel, Brameld, Craigon, Scollan, and Buttery (2007) maternal undernutrition increases fast-glycolytic fibers in lamb muscles, although these effects could be muscle-dependent. On the contrary, both Tygesen, Harrison, and Therkildsen (2007) and

Piaggio et al. (2018) reported an increase in slow-oxidative fibers in muscles from intrauterine restricted lambs. Furthermore, both Reed, Raja, Hoffman, Zinn, and Govoni (2014) and Sen et al. (2016) found no effect of maternal undernutrition on muscle fiber types in lambs.

Regarding meat quality, although most previous studies have reported few effects of maternal undernutrition on lamb meat quality (Luzardo, de Souza, Quintans, & Banchero, 2019; Piaggio et al., 2018; Sen et al., 2016; Tygesen et al., 2007) some others have reported significant but inconsistent effects of maternal undernutrition on ruminant meat quality (Krausgrill, Tulloh, Shorthose, & Sharpe, 1999; Maresca et al., 2019; Mohrhauser et al., 2015; Ramírez et al., 2020; Webb et al., 2019). Anyway, it is important to highlight that most studies evaluating maternal undernutrition effects on muscle traits show important differences regarding the timing, severity and type of undernourishment. Specifically in sheep, works evaluating exclusively energetic restriction during mid-late gestation (days 45–115) showed no effects on meat quality (Luzardo et al., 2019; Piaggio et al., 2018). Additionally, global maternal nutrient restriction exclusively during early-mid (days 30–80) (Sen et al., 2016) or late (last 6 weeks) (Tygesen et al., 2007) gestation

\* Corresponding author.

E-mail address: [javiithu@gmail.com](mailto:javiithu@gmail.com) (J. Ithurralde).

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108532>

Received 24 November 2020; Received in revised form 22 March 2021; Accepted 29 April 2021

Available online 2 May 2021

0309-1740/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

does not affect meat quality in lambs. Nevertheless, in an experiment in which, unlike the aforementioned, the focus was on inducing early gestational undernutrition (25–35% of maternal body weight reduction during the first 70 days of gestation), it was reported that maternal undernutrition improves meat tenderness in lambs (Krausgrill et al., 1999). Otherwise, in cattle, most studies have focused on evaluating the effects of mid-late maternal undernutrition on meat characteristics. According to Maresca et al. (2019) improved protein maternal nutrition during late gestation improves bovine meat tenderness. Also, Ramírez et al. (2020) reported that tenderness was decreased in moderate intrauterine energetic restricted calves compared to both severe restricted and unrestricted calves. On the contrary, Mohrhauser et al. (2015) reported that mid gestation energetic restriction improves bovine meat tenderness, while Webb et al. (2019) demonstrated that mid but not late intrauterine protein restricted steers showed less tender meat.

Moreover, although previous works indicate the existence of sex-dependent effects regarding the fetal onset of several developmental alterations (Grigore, Ojeda, & Alexander, 2008; Moritz et al., 2010), studies reporting sex-dependent effects of maternal undernutrition on muscle and meat traits in livestock are scarce. We recently demonstrated that a reduced forage allowance offered to ewes from early to late gestation (days 30–143) affects offspring growth rates, carcass composition and muscle weights, mostly in a sex-dependent manner (Ithurralde et al., 2019). Therefore, the aim of the present study was to evaluate whether such observed changes can also imply differences in muscle characteristics (fiber types, sarcomere length, lipid, glycogen and lactate content) and meat quality traits (instrumental meat tenderness and cooking losses) in muscles from 200-day old male and female lambs.

## 2. Materials and methods

Experimental procedures were approved by the Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA, Facultad de Agronomía, Universidad de la República). The experiment included two phases. The first phase included the experimental treatments applied to pregnant ewes, as well as lambs' breeding until weaning, and was performed at Estación Experimental Bernardo Rosengurt, Facultad de Agronomía (Cerro Largo, Uruguay; 32.3769° S, 54.1654° W). The second phase included lambs' fattening until slaughter and was performed at the Animal House, Facultad de Agronomía (Montevideo, Uruguay).

### 2.1. Animals

Animal management was previously published (Freitas de Melo et al., 2018; Ithurralde et al., 2019), and only a brief description is presented here. Multiparous Corriedale ewes were estrus synchronized, inseminated with fresh semen from two Corriedale rams and randomly assigned to two different natural pasture allowances from day 30 to day 143 of gestation. A completely randomized block design study was conducted in three blocks, where two pasture allowance treatments were applied. Sixteen (eight carrying male and eight carrying female lambs) and seventeen (seven carrying male and ten carrying female lambs) single bearing ewes grazed on high and low pasture allowance (HPA and LPA), respectively. Pasture allowances offered to HPA ewes were 14, 15 and 20 kg of dry matter/100 kg of body weight/day on days 30–60, 61–110 and 111–143 of gestation, respectively. Pasture allowances offered to LPA ewes were 6, 5 and 10 kg of dry matter/100 kg of body weight/day on days 30–60, 61–110 and 111–143 of gestation, respectively. Each experimental group had three replications (randomized block design with three replicates) within which ewes grazed. From day 100 of gestation until lambing ewes were daily supplemented with 300 g/animal of rice bran and from day 143 of gestation until weaning (90-day old lambs) all animals were kept in the same paddock grazing on non-restrictive natural pasture allowances and continued to be daily supplemented with the same amount of rice bran. Pasture availability

was determined monthly via the comparative yield method (Haydock & Shaw, 1975) and forage allowance was adjusted by including or removing “put-and-take” ewes from each paddock according to the body weight of all ewes (Freitas de Melo et al., 2015). Pasture consumption and estimated energy and protein balance of HPA and LPA ewes during gestation were previously reported (Freitas de Melo et al., 2018). Food intake was estimated as the difference between pasture availability and pasture remnant, which was the available amount for the following month. Pasture growth rate was calculated using mobile cages and added to the month value. Pastures samples were taken for each period, and from each sample, crude protein, ashes and neutral detergent fiber were determined in the Laboratory of Animal Nutrition (Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay). Pasture energy content was estimated as metabolizable energy (NRC, 2007). The protein and energy requirements were based on the 1985 (NRC, 1985) and 2007 NRC tables, respectively. Estimated energy balance remained over 100% in HPA ewes (175, 134 and 165%, on days 50, 100 and 143 of gestation, respectively), but not in LPA ewes (122, 69 and 156% on days 50, 100 and 143 of gestation, respectively). Estimated protein balance on HPA ewes was 117, 78 and 92% on days 50, 100 and 143 of gestation, respectively, while LPA ewes had an estimated protein balance of 76, 41 and 88% for the same periods (Freitas de Melo et al., 2018). Treatment effects on ewes and lambs body weights were previously reported (Ithurralde et al., 2019). Ewes from the HPA group showed greater mean gestational body weight ( $P < 0.01$ ; Ithurralde et al., 2019).

Lambs were weaned at 90 days old and fattened until slaughtering at 200 days old. No differences were detected between HPA and LPA lambs in birth weight. However, male HPA lambs were heavier ( $P < 0.01$ ) at day 90 than LPA male lambs, while no differences were detected between HPA and LPA female lambs (Ithurralde et al., 2019). After weaning, lambs were housed in individual pens, *ad libitum* fed with a mixed diet (alfalfa hay and commercial mixed ration) and maintained with free access to water. During the fattening period male HPA lambs were heavier ( $P < 0.01$ ) than male LPA lambs, while no differences were detected between HPA and LPA female lambs (Ithurralde et al., 2019). At 200 days old, all lambs were slaughtered following standard procedures in a mobile slaughterhouse (Unidad de Faena Móvil, Instituto Nacional de Carnes, Uruguay). Carcass conformation and meat yield were affected by maternal undernutrition mostly in a sex-dependent manner. Sex-dependent muscle weight reduction was found for muscles *Gluteobiceps*, *Supraspinatus* and *Semitendinosus* ( $P = 0.02$ , sex-by-treatment interaction), with males but not females being affected (Ithurralde et al., 2019). After weighing, samples from each muscle (*Gluteobiceps*, *Supraspinatus* and *Semitendinosus*) were vacuum-packaged and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until determinations of total lipids, glycogen, lactate content, and meat quality traits.

### 2.2. Histological determinations

After slaughter samples were taken from the central superficial part of the *Semitendinosus*, cranial *Gluteobiceps*, and *Supraspinatus* muscles. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) until processing. Sample fixation never exceeded 40 min after animal death. Samples were included in cryostat embedding medium (Cryomatrix, Thermo Shandon Limited, USA), and 24  $\mu\text{m}$ -thick sections were cut in a cryostat. The nicotinic adenine dinucleotide (reduced) tetrazolium reductase (NADH-TR) technique was used (Dubowitz & Brooke, 1973) to classify fibers as oxidative (highly stained), intermediate (less intensely stained) or glycolytic (negatively stained) (Ithurralde et al., 2015). Also, sections were stained with PAS according to the standard procedure (Schaart et al., 2004). Briefly, sections were pretreated with 1% periodic acid followed by a washing step. Then, slides were treated with Schiff's reagent for 15 min and washed. PAS staining allowed the identification of three different levels of positive stains: strongly, intermediate and weakly PAS-stained fibers (Fig. 1). Morphometric analyses were performed using an image analysis system (Infinity analyze®,

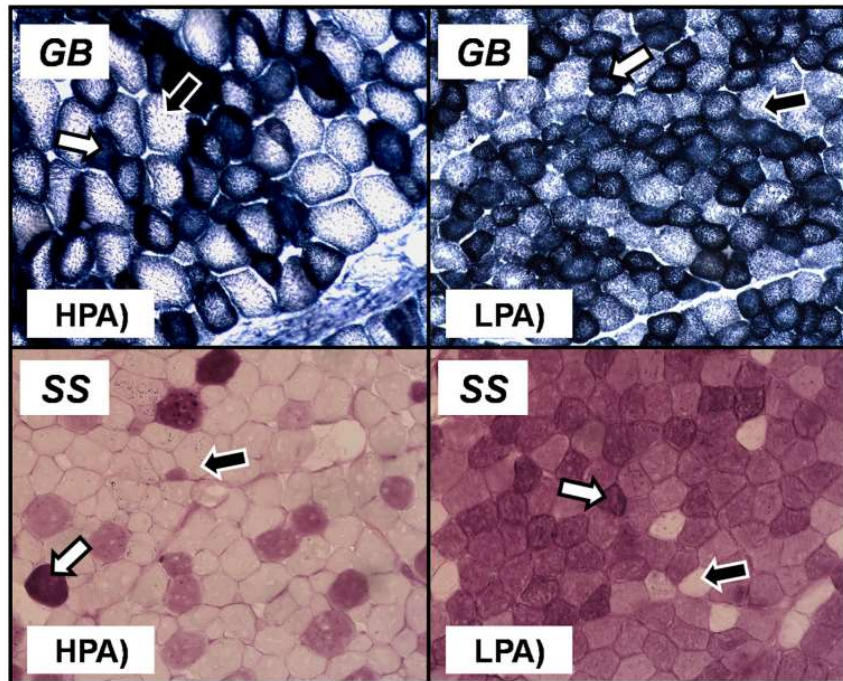


Fig. 1. Histological transverse sections of muscles cranial *Gluteobiceps* (GB) and *Supraspinatus* (SS) from high (HPA) and low (LPA) pasture allowance lambs treated with the NADH-TZ (upper images) and PAS (lower images) histochemical techniques. Black-filled arrows show glycolytic and PAS weakly stained fibers in NADH-TZ and PAS images, respectively. White-filled arrows show oxidative and PAS strongly stained fibers in NADH-TZ and PAS images, respectively.

Toronto, Canada). The percentages of different metabolic and PAS positive fibers were calculated by counting at least 500 fibers from random microscopic fields. The fiber diameter was measured at its minimum value in order to avoid possible errors due to tilted sections (Dubowitz & Brooke, 1973) in at least 50 fibers of each type and was expressed as their mean value. A referenced grid containing 120 points was overlain on eight pictures/animal and muscle. The number of points hitting each fiber type was used to calculate the percentage volume (% V) of metabolic and different PAS positive fiber types (Ithurralde et al., 2015). The muscle oxidative (OA) and PAS positive (PPA) activity were estimated through oxidative and PAS positive scores, as follows: OA = (1 × percentage volume occupied by intermediate fibers) + (2 × percentage volume occupied by oxidative fibers); PPA = (1 × percentage volume occupied by PAS intermediately stained fibers) + (2 × percentage volume occupied by PAS strongly stained fibers) (Ithurralde et al., 2015). Intramuscular adipocyte diameter was measured in PAS stained slides by averaging multiple (>50) individual adipocyte diameter measurements.

### 2.3. Total lipids, glycogen and lactate content in meat samples

Total lipids were extracted for each muscle in a chloroform:methanol (2:1) mixture as described by Folch, Lees, and Stanley (1957) using a Virtis homogenizer and quantified gravimetrically after evaporation with a Rotavapor. Glycogen and lactate content were measured 24 h

after slaughter. Meat samples from each muscle were frozen after 24 h of slaughter and stored until lactate and glycogen determinations. Therefore glycogen and lactate content were determined in frozen meat after 24 h of carcass chilling. For both determinations, an 8 g meat sample was homogenized and extracted with 8 ml of HCl (4 N) for 2 h at 100 °C, filtered and neutralized by adding NaOH (4 N) until pH reached 6.5–7. Glycogen was determined as glucose total equivalents following Bergmeyer and Bernt (1974) using colorimetric diagnostic kits (1,001,201, Spinreact, Spain) and expressed as g glucose/100 g fresh meat. Lactate was assayed in the same hydrolysed slurry using commercially available enzymatic colorimetric diagnostic kits (LO-POD; 1,001,330; Spinreact, Spain) and expressed as g lactate/kg fresh meat.

### 2.4. Sarcomere length

Sarcomere length was measured histologically. Meat samples were immersion-fixed in 2.5% glutaraldehyde and an image analysis system (Infinity analyze®, Toronto, Canada) was used to measure sarcomere length by counting the number of A-bands along an arbitrary distance (70–140 mm) in each of 30 myofibrils within the muscle sample. Therefore, sarcomere length was calculated by dividing the measured distance for the number of A-bands included in the measured segment (Ithurralde et al., 2018).

## 2.5. Warner-Bratzler shear force and cooking losses

Tenderness was determined in cooked meat through Warner Bratzler (WB) shear force. Meat samples (weighing approximately 80 g) from each muscle were obtained after 24 h of carcass chilling, vacuum packed, frozen, and stored until meat quality determinations. Therefore, both WB shear force and cooking losses were determined in frozen samples collected after 24 h of carcass aging. Cores, 1.27 cm in cross-section, were cut with muscle fibers parallel to the longitudinal axis of the sample. Samples were tested with a Warner-Bratzler shear device mounted on an Instron series 3342 after cooking in a thermostatic water bath at 75 °C until the internal temperature reached 71 °C. After cooking in plastic bags, samples were dried with paper towel and re-weighed to determine cooking losses.

## 2.6. Statistical analyses

All data were analyzed in a randomized block design using the SAS Systems software (SAS 9.0 V; SAS Institute, Cary, NC, USA). Muscle and meat traits were analyzed using a mixed model (PROC MIXED). The adjusted models included the treatment (HPA vs. LPA), the sex, and their interactions as fixed effects and the block and ram as random effects. The interaction between treatment and block was included in the models as random effect but it was removed from them when the estimate of the covariance parameter was zero or near zero. Individual muscle weight was included as a covariate for the analysis of muscle histological traits when the effect of treatment was significant to determine if differences in muscle characteristics were independent of muscle weight. The experimental unit for all animal traits was the ewe-lamb pair within each treatment and repetition (Adams, Nielsen, Schacht, & Clark, 2000). Post-hoc comparisons were carried out with the Tukey-Kramer test. Statistical differences were considered when  $P \leq 0.05$ , and tendencies when  $0.05 < P \leq 0.10$ . Data are expressed as least square means  $\pm$  SEM. Selected Pearson correlation coefficients between muscle histological-biochemical traits and meat-quality traits were generated within each muscle by using the statistical software package Statistica® (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

## 3. Results

### 3.1. Histological characteristics

The effects of a reduced maternal forage allowance on the histological characteristics of muscles cranial *Gluteobiceps*, *Supraspinatus* and *Semitendinosus*, are shown in Tables 1, 3 and 5, respectively. Treatment effects on fiber type characteristics are exemplified in Fig. 1. Maternal undernutrition increased the proportion of oxidative fibers in all muscles ( $P < 0.0022$ ), increased the oxidative score in muscle *Semitendinosus* ( $P < 0.0001$ ) and tended to increase it in muscles *Supraspinatus* and cranial *Gluteobiceps* ( $P = 0.06$ ). Furthermore, the proportion of glycolytic fibers was reduced in all muscles from LPA lambs ( $P \leq 0.010$ ). Also, LPA lambs showed reduced mean diameters of glycolytic fibers ( $P < 0.0318$ ) and increased PPA ( $P \leq 0.06$ ) in muscles *Supraspinatus* and *Semitendinosus*.

Additionally, some interactions between lamb-sex and maternal forage allowance were detected (Tables 1, 3 and 5). Maternal undernutrition reduced the mean diameter of glycolytic fibers in the cranial *Gluteobiceps* of female but not male lambs, while it increased sarcomere length in the cranial *Gluteobiceps* of male but not female lambs (Table 1). Moreover, maternal undernutrition reduced the mean diameter of oxidative fibers in both the *Supraspinatus* and *Semitendinosus* of male but not female lambs (Tables 3 and 5).

### 3.2. Biochemical and meat quality characteristics

The effects of a reduced maternal forage allowance on biochemical and meat quality characteristics of muscles cranial *Gluteobiceps*, *Supraspinatus* and *Semitendinosus*, are shown in Tables 2, 4 and 6, respectively. Maternal undernutrition tended to increase total glycogen content in both the cranial *Gluteobiceps* and the *Supraspinatus* muscles (Tables 2 and 4). Also, maternal undernutrition tended to reduce WB shear force in muscle cranial *Gluteobiceps* (Table 2).

Additionally, some interactions between lamb-sex and maternal forage allowance were detected for biochemical and meat quality traits (Tables 2, 4 and 6). Total lipid content was increased in the *Supraspinatus* from female but not male LPA lambs (Table 4). Furthermore, maternal undernutrition reduced total lactate content and WB shear force in the *Semitendinosus* from female but not male lambs, while it increased cooking losses in the *Semitendinosus* of male but not female lambs (Table 6).

**Table 1**

Histological characteristics (means  $\pm$  SEM) of HPA and LPA male, female and both pooled sexes lambs in muscle Cranial *Gluteobiceps*: Proportion of oxidative (%Oxi) and glycolytic (%Gly) fibers, Diameters of oxidative (OD) and glycolytic (GD) fibers, Oxidative activity (OA), Proportion of PAS strongly (%PS) and weakly (%PW) stained fibers, Diameters of PAS strongly (PSD) and weakly (PWD) stained fibers, PAS positive activity (PPA), Sarcomere length (SL), and Perimysial adipocyte diameter (AD).

|                | HPA <sup>1</sup>               |                              |                               | LPA <sup>2</sup>              |                              |                               | P value treatment | P value Sex *treatment |
|----------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------|------------------------|
|                | Males & Females                | Males                        | Females                       | Males & Females               | Males                        | Females                       |                   |                        |
| %Oxi           | 28.98 $\pm$ 2.50 <sup>b</sup>  | 27.47 $\pm$ 2.71             | 28.87 $\pm$ 2.73              | 35.17 $\pm$ 2.55 <sup>a</sup> | 37.34 $\pm$ 2.85             | 34.96 $\pm$ 2.70              | 0.0223            | 0.9910                 |
| % Gly          | 40.19 $\pm$ 2.88 <sup>b</sup>  | 36.23 $\pm$ 3.54             | 44.14 $\pm$ 3.32              | 33.29 $\pm$ 2.93 <sup>b</sup> | 31.72 $\pm$ 3.43             | 34.87 $\pm$ 3.27              | 0.0101            | 0.3574                 |
| OD ( $\mu$ m)  | 35.00 $\pm$ 2.15               | 33.89 $\pm$ 2.69             | 36.13 $\pm$ 2.52              | 34.99 $\pm$ 2.21              | 34.69 $\pm$ 2.61             | 35.28 $\pm$ 2.49              | 0.9930            | 0.6817                 |
| GD ( $\mu$ m)  | 51.34 $\pm$ 2.03 <sup>x</sup>  | 45.74 $\pm$ 3.13             | 54.42 $\pm$ 2.94 <sup>x</sup> | 46.76 $\pm$ 2.10 <sup>y</sup> | 49.37 $\pm$ 3.03             | 49.04 $\pm$ 2.89 <sup>y</sup> | 0.0616            | 0.0520                 |
| OA             | 158.76 $\pm$ 5.36 <sup>y</sup> | 164.89 $\pm$ 6.88            | 152.63 $\pm$ 6.38             | 168.88 $\pm$ 5.4 <sup>x</sup> | 173.36 $\pm$ 6.61            | 164.41 $\pm$ 6.23             | 0.0595            | 0.7576                 |
| %PS            | 24.92 $\pm$ 2.87               | 23.62 $\pm$ 4.19             | 26.22 $\pm$ 3.92              | 28.65 $\pm$ 2.73              | 26.67 $\pm$ 4.19             | 30.63 $\pm$ 3.51              | 0.3567            | 0.8649                 |
| %PW            | 40.84 $\pm$ 3.34               | 39.63 $\pm$ 4.88             | 42.05 $\pm$ 4.56              | 39.13 $\pm$ 3.18              | 40.77 $\pm$ 4.88             | 37.49 $\pm$ 4.08              | 0.7144            | 0.5424                 |
| PSD ( $\mu$ m) | 42.35 $\pm$ 2.19               | 41.69 $\pm$ 3.21             | 42.99 $\pm$ 3.01              | 40.65 $\pm$ 2.09              | 40.61 $\pm$ 3.21             | 40.69 $\pm$ 2.68              | 0.5815            | 0.8441                 |
| PWD ( $\mu$ m) | 44.17 $\pm$ 1.56               | 44.06 $\pm$ 2.24             | 44.28 $\pm$ 1.93              | 45.84 $\pm$ 1.49              | 46.64 $\pm$ 2.01             | 45.05 $\pm$ 1.75              | 0.3582            | 0.6203                 |
| PPA            | 197.06 $\pm$ 6.12              | 193.04 $\pm$ 8.94            | 201.09 $\pm$ 8.36             | 192.70 $\pm$ 5.83             | 186.73 $\pm$ 8.94            | 198.67 $\pm$ 7.48             | 0.6102            | 0.8204                 |
| SL ( $\mu$ m)  | 1.63 $\pm$ 0.08                | 1.57 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup> | 1.69 $\pm$ 0.11               | 1.76 $\pm$ 0.07               | 1.96 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup> | 1.55 $\pm$ 0.09               | 0.2489            | 0.0221                 |
| AD ( $\mu$ m)  | 44.99 $\pm$ 2.44               | 42.68 $\pm$ 3.34             | 47.32 $\pm$ 3.18              | 43.08 $\pm$ 2.35              | 39.48 $\pm$ 3.34             | 46.68 $\pm$ 2.86              | 0.5239            | 0.6717                 |

Within the same row and sex, those means followed by different superscripts differed (a vs b;  $P \leq 0.05$ ) or tended to differ (x vs y;  $P \leq 0.10$ ).

<sup>1</sup> HPA: High pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 14, 15 and 20 kg of dry matter/100 kg of body weight/day on days 30–60, 61–110 and 111–143 of gestation, respectively. n = 16 (8 males and 8 females).

<sup>2</sup> LPA: Low pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 6, 5 and 10 kg of dry matter/100 kg of body weight/day on days 30–60, 61–110 and 111–143 of gestation, respectively. n = 17 (7 males and 10 females).

**Table 2**

Biochemical and meat quality traits (means  $\pm$  SEM) of HPA and LPA male, female and both pooled sexes lambs in muscle *Cranial Gluteobiceps*: Glycogen content (GL), Lactate content (LT), Percentage of lipids (%LP), Warner Bratzler shear force (WB) and Cooking losses (CL).

|              | HPA <sup>1</sup>              |                  |                  | LPA <sup>2</sup>              |                  |                  | P value treatment | P value Sex *treatment |
|--------------|-------------------------------|------------------|------------------|-------------------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------------|
|              | Males & Females               | Males            | Females          | Males & Females               | Males            | Females          |                   |                        |
| GL (g/100 g) | 0.269 $\pm$ 0.06 <sup>y</sup> | 0.229 $\pm$ 0.08 | 0.309 $\pm$ 0.08 | 0.404 $\pm$ 0.05 <sup>x</sup> | 0.312 $\pm$ 0.08 | 0.496 $\pm$ 0.07 | 0.0904            | 0.4967                 |
| LT (g/kg)    | 1.17 $\pm$ 0.06               | 1.17 $\pm$ 0.07  | 1.16 $\pm$ 0.07  | 1.21 $\pm$ 0.05               | 1.13 $\pm$ 0.07  | 1.28 $\pm$ 0.06  | 0.4747            | 0.1784                 |
| %LP          | 4.81 $\pm$ 0.35               | 5.01 $\pm$ 0.49  | 4.62 $\pm$ 0.49  | 4.76 $\pm$ 0.35               | 4.34 $\pm$ 0.53  | 5.18 $\pm$ 0.44  | 0.9133            | 0.2269                 |
| WB (N)       | 46.18 $\pm$ 2.75 <sup>x</sup> | 39.51 $\pm$ 3.82 | 52.84 $\pm$ 3.82 | 39.50 $\pm$ 2.74 <sup>y</sup> | 31.67 $\pm$ 4.21 | 47.45 $\pm$ 3.63 | 0.1018            | 0.7642                 |
| CL (%)       | 22.05 $\pm$ 1.02              | 21.05 $\pm$ 1.31 | 23.05 $\pm$ 1.32 | 21.29 $\pm$ 1.01              | 21.99 $\pm$ 1.34 | 20.60 $\pm$ 1.19 | 0.5158            | 0.1527                 |

Within the same row and sex, those means followed by different superscripts differed (a vs b;  $P \leq 0.05$ ) or tended to differ (x vs y;  $P \leq 0.10$ ).

<sup>1</sup> HPA: High pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 14, 15 and 20 kg of dry matter/100 kg of body weight/day on days 30–60, 61–110 and 111–143 of gestation, respectively.  $n = 16$  (8 males and 8 females).

<sup>2</sup> LPA: Low pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 6, 5 and 10 kg of dry matter/100 kg of body weight/day on days 30–60, 61–110 and 111–143 of gestation, respectively.  $n = 17$  (7 males and 10 females).

**Table 3**

Histological characteristics (means  $\pm$  SEM) of HPA and LPA male, female and both pooled sexes lambs in muscle *Supraspinatus*: Proportion of oxidative (%Oxi) and glycolytic (%Gly) fibers, Diameters of oxidative (OD) and glycolytic (GD) fibers, Oxidative activity (OA), Proportion of PAS strongly (%PS) and weakly (%PW) stained fibers, Diameters of PAS strongly (PSD) and weakly (PWD) stained fibers, PAS positive activity (PPA), Sarcomere length (SL), and Perimysial adipocyte diameter (AD).

|                | HPA <sup>1</sup>                |                               |                               | LPA <sup>2</sup>                |                               |                               | P value treatment | P value Sex *treatment |
|----------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------|------------------------|
|                | Males & Females                 | Males                         | Females                       | Males & Females                 | Males                         | Females                       |                   |                        |
| %Oxi           | 25.84 $\pm$ 1.68 <sup>b</sup>   | 25.51 $\pm$ 2.38              | 26.17 $\pm$ 2.38              | 37.85 $\pm$ 1.66 <sup>a</sup>   | 37.93 $\pm$ 2.55              | 37.78 $\pm$ 2.13              | <0.0001           | 0.8631                 |
| % Gly          | 41.69 $\pm$ 1.45 <sup>a</sup>   | 42.11 $\pm$ 2.00              | 41.27 $\pm$ 2.00              | 30.50 $\pm$ 1.43 <sup>b</sup>   | 29.74 $\pm$ 2.12              | 31.26 $\pm$ 1.78              | <0.0001           | 0.5464                 |
| OD ( $\mu$ m)  | 49.05 $\pm$ 1.69 <sup>a</sup>   | 52.52 $\pm$ 2.30 <sup>a</sup> | 45.58 $\pm$ 2.31              | 44.04 $\pm$ 1.67 <sup>b</sup>   | 41.91 $\pm$ 2.43 <sup>b</sup> | 46.16 $\pm$ 2.07              | 0.0302            | 0.0171                 |
| GD ( $\mu$ m)  | 49.25 $\pm$ 1.50 <sup>a</sup>   | 50.05 $\pm$ 1.89              | 48.44 $\pm$ 1.92              | 44.65 $\pm$ 1.49 <sup>b</sup>   | 45.94 $\pm$ 1.99              | 43.65 $\pm$ 1.74              | 0.0078            | 0.9069                 |
| OA             | 171.66 $\pm$ 3.40 <sup>y</sup>  | 169.73 $\pm$ 4.81             | 173.59 $\pm$ 4.81             | 181.07 $\pm$ 3.35 <sup>x</sup>  | 180.17 $\pm$ 5.14             | 181.95 $\pm$ 4.30             | 0.0586            | 0.8296                 |
| %PS            | 8.93 $\pm$ 3.17 <sup>b</sup>    | 11.63 $\pm$ 3.89              | 6.23 $\pm$ 3.80               | 20.81 $\pm$ 3.14 <sup>a</sup>   | 24.14 $\pm$ 4.11              | 17.48 $\pm$ 3.35              | 0.0031            | 0.5535                 |
| %PW            | 75.34 $\pm$ 6.26 <sup>a</sup>   | 69.13 $\pm$ 7.71              | 81.56 $\pm$ 7.49              | 50.62 $\pm$ 6.21 <sup>b</sup>   | 45.21 $\pm$ 8.11              | 56.03 $\pm$ 6.61              | 0.0019            | 0.4227                 |
| PSD ( $\mu$ m) | 38.51 $\pm$ 1.87                | 40.91 $\pm$ 2.74              | 36.12 $\pm$ 2.53 <sup>b</sup> | 41.29 $\pm$ 1.84                | 38.97 $\pm$ 3.00              | 43.63 $\pm$ 2.12 <sup>a</sup> | 0.3008            | 0.0872                 |
| PWD ( $\mu$ m) | 51.68 $\pm$ 2.04                | 53.09 $\pm$ 2.69              | 50.27 $\pm$ 2.59              | 49.36 $\pm$ 2.01                | 48.55 $\pm$ 2.89              | 50.16 $\pm$ 2.21              | 0.3237            | 0.3482                 |
| PPA            | 134.80 $\pm$ 10.17 <sup>b</sup> | 141.45 $\pm$ 11.95            | 128.14 $\pm$ 11.64            | 168.47 $\pm$ 10.11 <sup>a</sup> | 175.42 $\pm$ 12.40            | 161.52 $\pm$ 10.53            | 0.0024            | 0.3816                 |
| SL ( $\mu$ m)  | 1.64 $\pm$ 0.07                 | 1.68 $\pm$ 0.09               | 1.61 $\pm$ 0.10               | 1.61 $\pm$ 0.07                 | 1.60 $\pm$ 0.10               | 1.61 $\pm$ 0.08               | 0.6937            | 0.6710                 |
| AD ( $\mu$ m)  | 43.75 $\pm$ 1.53                | 43.13 $\pm$ 2.23              | 44.36 $\pm$ 2.07              | 43.35 $\pm$ 1.51                | 41.18 $\pm$ 2.43              | 45.53 $\pm$ 1.73              | 0.8525            | 0.4673                 |

Within the same row and sex, those means followed by different superscripts differed (a vs b;  $P \leq 0.05$ ) or tended to differ (x vs y;  $P \leq 0.10$ ).

<sup>1</sup> HPA: High pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 14, 15 and 20 kg of dry matter/100 kg of body weight/day on days 30–60, 61–110 and 111–143 of gestation, respectively.  $n = 16$  (8 males and 8 females).

<sup>2</sup> LPA: Low pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 6, 5 and 10 kg of dry matter/100 kg of body weight/day on days 30–60, 61–110 and 111–143 of gestation, respectively.  $n = 17$  (7 males and 10 females).

**Table 4**

Biochemical and meat quality traits (means  $\pm$  SEM) of HPA and LPA male, female and both pooled sexes lambs in muscle *Supraspinatus*: Glycogen content (GL), Lactate content (LT), Percentage of lipids (%LP), Warner Bratzler shear force (WB) and Cooking losses (CL).

|              | HPA <sup>1</sup>              |                              |                              | LPA <sup>2</sup>              |                              |                              | P value treatment | P value Sex *treatment |
|--------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------|------------------------|
|              | Males & Females               | Males                        | Females                      | Males & Females               | Males                        | Females                      |                   |                        |
| GL (g/100 g) | 0.231 $\pm$ 0.02 <sup>y</sup> | 0.231 $\pm$ 0.03             | 0.231 $\pm$ 0.03             | 0.281 $\pm$ 0.02 <sup>x</sup> | 0.319 $\pm$ 0.03             | 0.244 $\pm$ 0.02             | 0.0653            | 0.1658                 |
| LT (g/kg)    | 0.75 $\pm$ 0.04               | 0.77 $\pm$ 0.06              | 0.73 $\pm$ 0.06              | 0.84 $\pm$ 0.04               | 0.82 $\pm$ 0.06              | 0.86 $\pm$ 0.05              | 0.1487            | 0.5048                 |
| %LP          | 5.76 $\pm$ 0.82               | 6.34 $\pm$ 0.89 <sup>x</sup> | 5.17 $\pm$ 0.90 <sup>y</sup> | 5.99 $\pm$ 0.82               | 4.79 $\pm$ 0.91 <sup>y</sup> | 7.19 $\pm$ 0.87 <sup>x</sup> | 0.6329            | 0.0013                 |
| WB (N)       | 29.41 $\pm$ 11.47             | 32.65 $\pm$ 2.35             | 26.27 $\pm$ 2.35             | 32.06 $\pm$ 11.47             | 34.80 $\pm$ 5.19             | 29.31 $\pm$ 2.05             | 0.2646            | 0.8451                 |
| CL (%)       | 33.43 $\pm$ 1.09              | 32.71 $\pm$ 1.37             | 34.16 $\pm$ 1.56             | 33.86 $\pm$ 1.02              | 35.26 $\pm$ 1.45             | 32.47 $\pm$ 1.24             | 0.7478            | 0.1254                 |

Within the same row and sex, those means followed by different superscripts differed (a vs b;  $P \leq 0.05$ ) or tended to differ (x vs y;  $P \leq 0.10$ ).

<sup>1</sup> HPA: High pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 14, 15 and 20 kg of dry matter/100 kg of body weight/day on days 30–60, 61–110 and 111–143 of gestation, respectively.  $n = 16$  (8 males and 8 females).

<sup>2</sup> LPA: Low pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 6, 5 and 10 kg of dry matter/100 kg of body weight/day on days 30–60, 61–110 and 111–143 of gestation, respectively.  $n = 17$  (7 males and 10 females).

### 3.3. Correlations between histological-biochemical and meat quality traits

Correlations between histological-biochemical and meat quality traits varied slightly among the three studied muscles (Table 7). Shear force was positively correlated with lactate content in both the *Supraspinatus* and *Cranial Gluteobiceps*, while it was positively correlated with the diameter of glycolytic fibers in the *Semitenidinosus* muscle. Cooking losses tended to be negatively correlated with the diameter of oxidative fibers in the *Semitenidinosus* muscle while they showed a negative correlation with lactate content in the *Cranial Gluteobiceps* muscle.

### 4. Discussion

The present study demonstrates that a reduced maternal forage allowance of natural grasslands under extensive grazing conditions induces fetal programming effects on muscle characteristics in 200-day old lambs. As mentioned earlier, previous reports evaluating maternal undernutrition effects on ruminant muscle and meat traits have presented scarce and inconsistent results, probably due to differences in the experimental approaches. In the present study, unlike most previous experiments, we focused on evaluating possible fetal programming

**Table 5**

Histological characteristics (means  $\pm$  SEM) of HPA and LPA male, female and both pooled sexes lambs in muscle *Semitendinosus*: Proportion of oxidative (%Oxi) and glycolytic (%Gly) fibers, Diameters of oxidative (OD) and glycolytic (GD) fibers, Oxidative activity (OA), Proportion of PAS strongly (%PS) and weakly (%PW) stained fibers, Diameters of PAS strongly (PSD) and weakly (PWD) stained fibers, PAS positive activity (PPA), Sarcomere length (SL), and Perimysial adipocyte diameter (AD).

|                | HPA <sup>1</sup>               |                               |                   | LPA <sup>2</sup>               |                               |                   | P value treatment | P value Sex *treatment |
|----------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|------------------------|
|                | Males & Females                | Males                         | Females           | Males & Females                | Males                         | Females           |                   |                        |
| %Oxi           | 19.23 $\pm$ 1.48 <sup>b</sup>  | 20.74 $\pm$ 2.32              | 17.72 $\pm$ 2.11  | 26.80 $\pm$ 1.46 <sup>a</sup>  | 28.91 $\pm$ 2.15              | 24.69 $\pm$ 1.87  | 0.0022            | 0.7849                 |
| % Gly          | 53.90 $\pm$ 1.46 <sup>a</sup>  | 51.14 $\pm$ 2.28              | 56.67 $\pm$ 2.08  | 42.94 $\pm$ 1.44 <sup>b</sup>  | 41.16 $\pm$ 2.11              | 44.71 $\pm$ 1.84  | <0.0001           | 0.6523                 |
| OD ( $\mu$ m)  | 31.82 $\pm$ 1.70 <sup>x</sup>  | 32.67 $\pm$ 2.01 <sup>a</sup> | 30.91 $\pm$ 2.10  | 28.92 $\pm$ 1.69 <sup>y</sup>  | 26.90 $\pm$ 2.09 <sup>b</sup> | 30.94 $\pm$ 1.94  | 0.0800            | 0.0889                 |
| GD ( $\mu$ m)  | 47.87 $\pm$ 1.84 <sup>a</sup>  | 45.91 $\pm$ 2.41              | 49.84 $\pm$ 2.28  | 43.44 $\pm$ 1.88 <sup>b</sup>  | 42.94 $\pm$ 2.34              | 43.94 $\pm$ 2.14  | 0.0318            | 0.4544                 |
| OA             | 139.14 $\pm$ 2.49 <sup>b</sup> | 145.15 $\pm$ 3.26             | 133.13 $\pm$ 3.47 | 160.65 $\pm$ 2.45 <sup>a</sup> | 161.52 $\pm$ 3.45             | 159.79 $\pm$ 3.59 | <0.0001           | 0.1165                 |
| %PS            | 23.13 $\pm$ 2.87               | 28.06 $\pm$ 3.92              | 18.21 $\pm$ 4.19  | 28.93 $\pm$ 2.79               | 30.83 $\pm$ 4.19              | 27.04 $\pm$ 3.69  | 0.1611            | 0.4559                 |
| %PW            | 48.02 $\pm$ 3.87 <sup>x</sup>  | 39.98 $\pm$ 5.29              | 56.06 $\pm$ 5.66  | 37.85 $\pm$ 3.77 <sup>y</sup>  | 34.75 $\pm$ 5.66              | 40.94 $\pm$ 4.99  | 0.0730            | 0.3700                 |
| PSD ( $\mu$ m) | 37.59 $\pm$ 2.22               | 37.92 $\pm$ 2.93              | 37.27 $\pm$ 3.11  | 35.15 $\pm$ 2.19               | 34.02 $\pm$ 3.12              | 36.27 $\pm$ 2.79  | 0.3933            | 0.6147                 |
| PWD ( $\mu$ m) | 47.43 $\pm$ 2.17 <sup>a</sup>  | 46.69 $\pm$ 2.58              | 48.17 $\pm$ 2.68  | 42.71 $\pm$ 2.17 <sup>b</sup>  | 42.48 $\pm$ 2.69              | 42.94 $\pm$ 2.50  | 0.0275            | 0.8050                 |
| PPA            | 175.07 $\pm$ 6.36 <sup>z</sup> | 186.56 $\pm$ 8.69             | 163.57 $\pm$ 9.29 | 192.52 $\pm$ 6.19 <sup>x</sup> | 198.93 $\pm$ 9.29             | 186.11 $\pm$ 8.19 | 0.0622            | 0.5727                 |
| SL ( $\mu$ m)  | 2.10 $\pm$ 0.07                | 2.09 $\pm$ 0.10               | 2.12 $\pm$ 0.10   | 2.20 $\pm$ 0.07                | 2.15 $\pm$ 0.11               | 2.25 $\pm$ 0.09   | 0.3445            | 0.7173                 |
| AD ( $\mu$ m)  | 45.58 $\pm$ 1.83 <sup>x</sup>  | 43.52 $\pm$ 2.21              | 47.63 $\pm$ 2.31  | 42.01 $\pm$ 1.83 <sup>y</sup>  | 40.13 $\pm$ 2.32              | 43.88 $\pm$ 2.14  | 0.0603            | 0.9218                 |

Within the same row and sex, those means followed by different superscripts differed (a vs b;  $P \leq 0.05$ ) or tended to differ (x vs y;  $P \leq 0.10$ ).

<sup>1</sup> HPA: High pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 14, 15 and 20 kg of dry matter/100 kg of body weight/day on days 30–60, 61–110 and 111–143 of gestation, respectively.  $n = 16$  (8 males and 8 females).

<sup>2</sup> LPA: Low pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 6, 5 and 10 kg of dry matter/100 kg of body weight/day on days 30–60, 61–110 and 111–143 of gestation, respectively.  $n = 17$  (7 males and 10 females).

**Table 6**

Biochemical and meat quality traits (means  $\pm$  SEM) of HPA and LPA male, female and both pooled sexes lambs in muscle *Semitendinosus*: Glycogen content (GL), Lactate content (LT), Percentage of lipids (%LP), Warner Bratzler shear force (WB) and Cooking losses (CL).

|              | HPA <sup>1</sup> |                               |                               | LPA <sup>2</sup> |                               |                               | P value treatment | P value Sex *treatment |
|--------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------|------------------------|
|              | Males & Females  | Males                         | Females                       | Males & Females  | Males                         | Females                       |                   |                        |
| GL (g/100 g) | 0.343 $\pm$ 0.04 | 0.402 $\pm$ 0.06              | 0.285 $\pm$ 0.05              | 0.378 $\pm$ 0.04 | 0.433 $\pm$ 0.06              | 0.325 $\pm$ 0.05              | 0.5193            | 0.9347                 |
| LT (g/kg)    | 1.22 $\pm$ 0.07  | 1.09 $\pm$ 0.09               | 1.34 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>  | 1.19 $\pm$ 0.07  | 1.23 $\pm$ 0.09               | 1.16 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>  | 0.7643            | 0.0313                 |
| %LP          | 5.32 $\pm$ 0.63  | 4.99 $\pm$ 0.70               | 5.65 $\pm$ 0.71               | 4.79 $\pm$ 0.63  | 3.93 $\pm$ 0.72               | 5.66 $\pm$ 0.68               | 0.2545            | 0.2605                 |
| WB (N)       | 33.82 $\pm$ 1.47 | 32.25 $\pm$ 1.76              | 35.29 $\pm$ 1.76 <sup>a</sup> | 39.51 $\pm$ 2.75 | 34.51 $\pm$ 1.86              | 31.18 $\pm$ 1.67 <sup>b</sup> | 0.4495            | 0.0211                 |
| CL (%)       | 26.48 $\pm$ 1.03 | 25.29 $\pm$ 1.22 <sup>b</sup> | 27.67 $\pm$ 1.23 <sup>x</sup> | 27.02 $\pm$ 1.02 | 28.56 $\pm$ 1.27 <sup>a</sup> | 25.47 $\pm$ 1.14 <sup>y</sup> | 0.5608            | 0.0069                 |

Within the same row and sex, those means followed by different superscripts differed (a vs b;  $P \leq 0.05$ ) or tended to differ (x vs y;  $P \leq 0.10$ ).

<sup>1</sup> HPA: High pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 14, 15 and 20 kg of dry matter/100 kg of body weight/day on days 30–60, 61–110 and 111–143 of gestation, respectively.  $n = 16$  (8 males and 8 females).

<sup>2</sup> LPA: Low pasture allowance lambs born to ewes which grazed on natural pastures at: 6, 5 and 10 kg of dry matter/100 kg of body weight/day on days 30–60, 61–110 and 111–143 of gestation, respectively.  $n = 17$  (7 males and 10 females).

**Table 7**

Selected Pearson correlation coefficients between histological-biochemical traits and meat-quality traits within each of the three studied muscles: GB (cranial *Gluteobiceps*); SS (*Supraspinatus*); ST (*Semitendinosus*).

| Meat-quality traits | Muscle | Histological-biochemical traits |                       |                    |                     |                    |                  |                 |               |                  |
|---------------------|--------|---------------------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|------------------|-----------------|---------------|------------------|
|                     |        | Oxidative activity              | PAS positive activity | Oxidative diameter | Glycolytic diameter | Adipocyte diameter | Glycogen content | Lactate content | Lipid content | Sarcomere length |
| WB shear force      | GB     | −0.33*                          | 0.37**                | 0.05               | 0.19                | 0.33*              | 0.12             | 0.39**          | 0.06          | −0.19            |
|                     | SS     | −0.24                           | 0.19                  | −0.19              | 0.04                | 0.02               | 0.17             | 0.34**          | −0.03         | −0.05            |
|                     | ST     | −0.27                           | 0.07                  | −0.04              | 0.47***             | 0.11               | −0.17            | 0.16            | −0.30*        | −0.27            |
| Cooking losses      | GB     | −0.27                           | 0.05                  | 0.02               | 0.27                | 0.33*              | −0.01            | −0.43***        | −0.24         | 0.19             |
|                     | SS     | −0.27                           | 0.27                  | −0.28              | −0.03               | 0.01               | 0.12             | 0.04            | −0.09         | −0.14            |
|                     | ST     | 0.06                            | 0.19                  | −0.33*             | 0.09                | −0.22              | 0.18             | −0.07           | −0.18         | −0.08            |

\*\*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.05$ ; \*,  $P < 0.1$ .

effects on natural grazing conditions throughout sheep gestation, and demonstrated that nutrient restriction induced by a lower pasture allowance from early to late gestation induces long term effects on heavy lamb muscle traits. Generally, our results indicate that maternal undernutrition resulted in muscles with higher oxidative activity, fewer and smaller glycolytic fibers. Although controversy exists regarding maternal undernutrition effects on muscle characteristics in lambs (Daniel et al., 2007; Piaggio et al., 2018; Reed et al., 2014; Sen et al., 2016; Tygesen et al., 2007; Zhu et al., 2006) our results are generally

consistent with previous reports carried out in different species. According to Tygesen et al. (2007) 5-month old lambs born to late gestation nutrient restricted ewes show increased type I fiber area in the *Longissimus* muscle. More recently, Piaggio et al. (2018) reported that the percentage of oxidative fibers is higher in 6-month old lambs born to ewes submitted to mid-gestation energy restriction. Similarly, Dalle Zotte, Rémignon, and Chiericato (2005) reported that maternal feed rationing reduces the percentage of alpha white fibers in rabbits at weaning, while Mallinson et al. (2007) reported that maternal low-

protein diet during mid-gestation reduces fast fibers in rats. Similarly, Mohrhauser et al. (2015) reported that MHC-IIA expression was up-regulated in the *Semiteindinosus* from steers born to cows submitted to a negative energy status during mid-gestation, while Toscano, Manhães-de-Castro, and Canon (2008) found that a low protein diet during mid-gestation increases type IIA fibers in the *Soleus* of 25 and 90-day old rats. The generally increased oxidative activity found in muscles from LPA lambs in the present study might be associated with secondary myogenesis impairment induced by maternal undernutrition. Fetal secondary fibers are generally thought to differentiate mainly to fast-glycolytic fibers (Picard et al., 2002) and are known to be fewer due to maternal undernutrition (Dwyer, Stickland, & Fletcher, 1994; Zhu, Ford, Nathanielsz, & Du, 2004). Moreover, in sheep secondary fibers are formed approximately between days 30 and 80 of gestation (Picard et al., 2002; Wilson, McEwan, Sheard, & Harris, 1992), what matches with the main undernutrition period experienced by LPA ewes in the present study. In fact, we have recently reported that maternal undernutrition induced by a reduced pasture allowance from 23 days before conception affects secondary myogenesis in 70-day old sheep fetuses (Ithurralde et al., 2020). Another possible explanation to the higher oxidative activity found in muscles from LPA lambs might be related to differences in the relative degree of development between LPA and HPA lambs at slaughter, since muscle metabolism becomes more glycolytic with increasing development and growth (Lefaucheur & Gerrard, 2000). Additionally, in our present study maternal undernutrition also tended to increase total 24 h *postmortem* glycogen content in muscles cranial *Gluteobiceps* and *Supraspinatus*. This is consistent with our found changes in muscle fiber types and PPA since oxidative fibers have reduced glycolytic ability and therefore exhibit reduced glycogen breakdown. Furthermore, our found effects regarding muscle fiber diameters indicate that gestational undernutrition affected muscle fiber hypertrophic ability, which is consistent with Daniel et al. (2007) reporting that lambs born to undernourished ewes show reduced fiber diameters. Therefore, our results demonstrate that a reduced forage allowance of natural grasslands offered to pregnant ewes between days 30 and 143 of gestation can affect both the metabolic properties of muscle fibers as well as their morphometric characteristics in muscles from 200-day old lambs.

Furthermore, in the present study, to determine if our previously found sex-dependent fetal programming effects over growth and carcass composition (Ithurralde et al., 2019) could also imply sex-dependent effects in muscle characteristics, we studied the interaction between maternal undernutrition and sex for all traits. As we had hypothesized, maternal undernutrition affected some muscle and meat traits in a sex-dependent manner. Our found sex-dependent fetal programming effects on muscle and meat traits are somewhat consistent with previous reports (Daniel et al., 2007; Mallinson et al., 2007). According to Daniel et al. (2007), maternal undernutrition reduces the diameter of all fibers in the *Longissimus* muscle from male but not female lambs, while it increases the proportion of IIA fibers in the *Semiteindinosus* of female but not male lambs. Also, Mallinson et al. (2007) reported that fiber diameters were reduced by maternal low protein diet in the *Gastrocnemius* of male but not female rats. Our present findings demonstrate the hypothesis that maternal undernutrition induces both sex and muscle dependent effects on muscle characteristics and suggest that these effects are mainly evidenced by specific differences in fiber sizes. Apparently, in female lambs, maternal undernutrition mostly reduces the diameter of glycolytic fibers, while in male lambs maternal undernutrition mainly reduces the diameter of oxidative fibers. Thus, our present novel findings emphasize the importance of considering sex differences when exploring fetal programming effects on muscle characteristics in meat animals.

Moreover, the aforementioned findings can also be generally associated with some of our results regarding other muscle and meat traits such as WB shear force or lactate content. Although in the present study maternal undernutrition effects on meat quality traits were slight, we found sex-dependent treatment effects on both cooking losses and WB

shear force. Maternal undernutrition reduced WB shear force in the *Semiteindinosus* from female but not male lambs, which can be related to the higher lipid content, reduced glycolytic fiber diameter and lower lactate content found in some muscles from LPA female but not male lambs in the present study. Meat tenderness has been negatively related to fast-glycolytic fibers in sheep (Ithurralde et al., 2018; Solomon & Lynch, 1988) and cattle (Maltin et al., 1998). Moreover, according to Maltin, Balcerzak, Tilley, and Delday (2003) larger fast-glycolytic fibers are correlated with poorer eating quality due to a greater accumulation of lactate. Therefore, the reduced WB shear force found in the *Semiteindinosus* from LPA female lambs could be associated with reduced glycolytic fiber diameter and lactate accumulation. In fact, in the present study we found positive correlations between shear force with both lactate content and the diameter of glycolytic fibers. Otherwise, our found effects regarding meat tenderness might not only be associated with fiber characteristics, but also with differences in other factors affecting meat tenderness such as collagen or lipid content. According to Mohrhauser et al. (2015) a negative energy status during mid gestation can be associated with improved meat tenderness in cattle due to reduced collagen content. Moreover, our found trend for a negative correlation between shear force and muscle lipid content may also partially contribute to understanding our found sex-dependent effects of maternal undernutrition on shear force, since maternal undernutrition induced an increase in lipid content in the *Supraspinatus* from female but not male lambs. On the other hand, in the present study cooking losses were also affected by maternal undernutrition in a sex-dependent manner. Additionally, we found a negative correlation between cooking losses and lactate content in the cranial *Gluteobiceps*. This negative association between cooking loss and muscle glycolytic potential might be related to the higher ability of oxidative muscles to hold water during *postmortem* evolution, frozen storage and thawing. As a matter of fact, previous research has associated greater water exudates with reduced cooking losses (Kim et al., 2013). On the other hand, we also found a trend for a negative correlation between the diameter of oxidative fibers and cooking losses in the *Semiteindinosus* muscle. This is consistent with Ithurralde et al. (2018) who negatively associated the diameter of type I fibers with expressed juice in sheep meat. Again, this found correlation might contribute to explain our found effect of maternal undernutrition on meat cooking losses, since maternal undernutrition increased cooking losses and reduced the diameter of oxidative fibers in the *Semiteindinosus* of male but not female lambs.

In summary, although further studies are required, our results generally demonstrate that maternal undernutrition effects on meat quality are less intense or clear as compared with maternal undernutrition effects on muscle histological traits. However, in light of our results, maternal undernutrition affects meat quality mostly in a sex and muscle dependent way. This is probably due to the complexity that characterizes meat quality traits such as tenderness, which depend on multiple interacting biological and environmental factors.

## 5. Conclusions

In conclusion, our present results indicate that gestational nutrient restriction under extensive grazing conditions induces fetal programming effects on metabolic fiber types in 200-day old lambs. Lambs born to undernourished sheep showed muscles with higher oxidative activities and reduced fiber diameters independently from muscle size.

Moreover, our study also suggests that maternal undernutrition might influence muscle and meat characteristics in a sex and muscle-dependent way. Therefore, the present study contributes to understanding the influence of maternal undernutrition on muscle characteristics suggesting that fetal programming effects on muscle composition and meat quality might be highly complex depending on different factors such as the muscle or the sex of the animal.

### Declaration of Competing Interest

We confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

### Acknowledgments

The authors acknowledge Ing. Agr. Carlos Mantero, Director of the “Estación Experimental Bernardo Rosengurtt”, and Ing. Agr. Laura Astigarraga, Director of the “Departamento de Producción Animal y Pasturas” for their support, and Ing. Agr. María José Abud, Ignacio Sosa and Nicolás Zunino for their help with pasture and animal management. We also thank Instituto Nacional de Carnes (Uruguay) who allowed use of their mobile slaughterhouse and Arch. Javier Díaz, Dr. Diego Petrone, Dr. María Belén López, Dr. Álvaro López-Pérez and Dr. Florencia Corrales for their help during slaughtering and sampling. We also thank Juan Iturralde for his contribution to improving the English language quality of this manuscript. This study was partially supported by research project CSIC-Iniciación/2017 awarded to J. Iturralde.

### References

- Adams, D. C., Nielsen, M. K., Schacht, W., & Clark, R. T. (2000). Designing and conducting experiments for range beef cows. *Faculty Papers and Publications in Animal Science*, 510.
- Bergmeyer, H. V., & Bernt, E. (1974). Amylo-1,6-glycosidase for the determination of glycogen. In H. V. Bergmeyer (Ed.), *Vol. 3. Methods of enzymatic analysis* (p. 1127). New York: Academic Press.
- Close, W. H., & Pettigrew, J. E. (1990). Mathematical models of sow reproduction. *Journal of Reproduction and Fertility*, 40, 83–88.
- Dalle Zotte, A., Rémignon, H., & Chiericato, G. M. (2005). Influence of maternal feed rationing on metabolic and contractile properties of longissimus lumborum muscle fibres in the rabbit offspring. *Meat Science*, 70(4), 573–577.
- Daniel, Z. C. T. R., Brameld, J. M., Craigon, J., Scollan, N. D., & Buttery, P. J. (2007). Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on lamb carcass characteristics and muscle fiber composition. *Journal of Animal Science*, 85, 1565–1576.
- Du, M., Wang, B., Fu, X., Yang, Q., & Zhu, M. J. (2015). Fetal programming in meat production. *Meat Science*, 109, 40–47.
- Dubowitz, V., & Brooke, M. H. (1973). *Muscle biopsy: A modern approach*. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Dwyer, C. M., Stickland, N. C., & Fletcher, J. M. (1994). The influence of maternal nutrition on muscle fiber number development in the porcine fetus and on subsequent postnatal growth. *Journal of Animal Science*, 72(4), 911–917.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.
- Freitas-de-Melo, A., Ungerfeld, R., Hötzel, M. J., Abud, M. J., Alvarez-Oxley, A., Orihuela, A., ... 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.
- Freitas de Melo, A., Terrazas, A., Ungerfeld, R., Hötzel, M. J., Orihuela, A., & Pérez-Clariget, R. (2018). Influence of low pasture allowance during pregnancy on the attachment between ewes and their lambs at birth and during lactation. *Applied Animal Behaviour Science*, 199, 9–16.
- Grigore, D., Ojeda, N. B., & Alexander, B. T. (2008). Sex differences in the fetal programming of hypertension. *Gender Medicine*, 5, S121–S122.
- Haydock, K. P., & Shaw, N. H. (1975). The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 15(76), 663–670.
- Iturralde, J., Bianchi, G., Feed, O., Nan, F., Ballesteros, F., Garibotto, G., & Bielli, A. (2018). Variation in instrumental meat quality among 15 muscles from 14-month-old sheep and its relationship with fibre typing. *Animal Production Science*, 58(7), 1358–1365.
- Iturralde, J., Bianchi, G., Feed, O., Nan, F., Garibotto, G., & Bielli, A. (2015). Histochemical fiber types in 16 heavy-lamb skeletal muscles. *Small Ruminant Research*, 125, 88–92.
- Iturralde, J., Genovese, P., Abud, M. J., López-Pérez, Á., Pérez-Clariget, R., & Bielli, A. (2020). Maternal undernutrition affects secondary myogenesis in a muscle-dependent way across the major muscles of 70-day old ovine fetuses. *Small Ruminant Research*, 191, 106174.
- Iturralde, J., Pérez-Clariget, R., Corrales, F., Fila, D., López-Pérez, Á., de Jesús Marichal, M., & ... & Bielli, A. (2019). Sex-dependent effects of maternal undernutrition on growth performance, carcass characteristics and meat quality of lambs. *Livestock Science*, 221, 105–114.
- Kim, G. D., Jung, E. Y., Lim, H. J., Yang, H. S., Joo, S. T., & Jeong, J. Y. (2013). Influence of meat exudates on the quality characteristics of fresh and freeze-thawed pork. *Meat Science*, 95(2), 323–329.
- Krausgrill, D. L., Tulloh, N. M., Shorthose, W. R., & Sharpe, K. (1999). Effects of weight loss in ewes in early pregnancy on muscles and meat quality of lambs. *The Journal of Agricultural Science*, 132(1), 103–116.
- Lefaucheur, L., & Gerrard, D. (2000). Muscle fiber plasticity in farm mammals. *Journal of Animal Science*, 77, 1–19.
- Luzardo, S., de Souza, G., Quintans, G., & Banchero, G. (2019). Refeeding ewe's ad libitum after energy restriction during mid-pregnancy does not affect lamb feed conversion ratio, animal performance and meat quality. *Small Ruminant Research*, 180, 57–62.
- Mallinson, J. E., Sculley, D. V., Craigon, J., Plant, R., Langley-Evans, S. C., & Brameld, J. M. (2007). Fetal exposure to a maternal low-protein diet during mid-gestation results in muscle-specific effects on fibre type composition in young rats. *British Journal of Nutrition*, 98(2), 292–299.
- Maltin, C., Balcerzak, D., Tilley, R., & Delday, M. (2003). Determinants of meat quality: Tenderness. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(2), 337–347.
- Maltin, C. A., Sinclair, K. D., Warriss, P. D., Grant, C. M., Porter, A. D., Delday, M. I., & Warkup, C. C. (1998). The effects of age at slaughter, genotype and finishing system on the biochemical properties, muscle fibre type characteristics and eating quality of bull beef from suckled calves. *Animal Science*, 66(2), 341–348.
- Maresca, S., Valiente, S. L., Rodríguez, A. M., Testa, L. M., Long, N. M., Quintans, G. I., & Pavan, E. (2019). The influence of protein restriction during mid-to late gestation on beef offspring growth, carcass characteristic and meat quality. *Meat Science*, 153, 103–108.
- Mohrhauser, D. A., Taylor, A. R., Underwood, K. R., Pritchard, R. H., Wertz-Lutz, A. E., & Blair, A. D. (2015). The influence of maternal energy status during mid-gestation on beef offspring carcass characteristics and meat quality. *Journal of Animal Science*, 93(2), 786–793.
- Moritz, K. M., Coffe, J. S. M., Wilson, L. B., Dickinson, H., Wlodek, M. E., Simmons, D. G., & Denton, K. M. (2010). Sex specific programming: A critical role for the renal renin-angiotensin system. *Placenta*, 31, S40–S46.
- NRC. (1985). *Nutrient requirements of sheep*. Natl Academy Pr.
- NRC. (2007). *Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and New World camelids*. Natl Academy Pr.
- Piaggio, L., Quintans, G., San Julian, R., Ferreira, G., Iturralde, J., Fierro, S., ... Banchero, G. E. (2018). Growth, meat and feed efficiency traits of lambs born to ewes submitted to energy restriction during mid-gestation. *Animal*, 12(2), 256–264.
- Picard, B., Lefaucheur, L., Berri, C., & Duclos, M. J. (2002). Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reproduction Nutrition Development*, 42(5), 415–431.
- Ramírez, M., Testa, L. M., Valiente, S. L., La Torre, E., Long, N. M., Rodríguez, A. M., ... Maresca, S. (2020). Maternal energy status during late gestation: Effects on growth performance, carcass characteristics and meat quality of steers progeny. *Meat Science*, 164, 108095.
- Reed, S. A., Raja, J. S., Hoffman, M. L., Zinn, S. A., & Govoni, K. E. (2014). Poor maternal nutrition inhibits muscle development in ovine offspring. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5(1), 43.
- Schaart, G., Hesselink, R. P., Keizer, H. A., van Kranenburg, G., Drost, M. R., & Hesselink, M. K. (2004). A modified PAS stain combined with immunofluorescence for quantitative analyses of glycogen in muscle sections. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(2), 161–169.
- Sen, U., Sirin, E., Ensoy, U., Aksoy, Y., Ulutas, Z., & Kuran, M. (2016). The effect of maternal nutrition level during mid-gestation on postnatal muscle fibre composition and meat quality in lambs. *Animal Production Science*, 56(5), 834–843.
- Solomon, M. B., & Lynch, G. P. (1988). Biochemical, histochemical and palatability characteristics of young ram lambs as affected by diet and electrical stimulation. *Journal of Animal Science*, 66(8), 1955–1962.
- Toscano, A. E., Manhães-de-Castro, R., & Canon, F. (2008). Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition*, 24(3), 270–278.
- Tygesen, M. P., Harrison, A. P., & Therkildsen, M. (2007). The effect of maternal nutrient restriction during late gestation on muscle, bone and meat parameters in five month old lambs. *Livestock Science*, 110(3), 230–241.
- Webb, M. J., Block, J. J., Funston, R. N., Underwood, K. R., Legako, J. F., Hart, A. A., ... Blair, A. D. (2019). Influence of maternal protein restriction in primiparous heifers during mid-and/or late-gestation on meat quality and fatty acid profile of progeny. *Meat Science*, 152, 31–37.
- Wilson, S. J., McEwan, J. C., Sheard, P. W., & Harris, A. J. (1992). Early stages of myogenesis in a large mammal: Formation of successive generations of myotubes in sheep tibialis cranialis muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 13(5), 534–550.
- Zhu, M. J., Ford, S. P., Means, W. J., Hess, B. W., Nathanielsz, P. W., & Du, M. (2006). Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *The Journal of Physiology*, 575(1), 241–250.
- Zhu, M. J., Ford, S. P., Nathanielsz, P. W., & Du, M. (2004). Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biology of Reproduction*, 71(6), 1968–1973.

## **6. DISCUSIÓN GENERAL**

### **6.1 UNA MENOR OFERTA DE CAMPO NATURAL GESTACIONAL AFECTA EL DESARROLLO MUSCULAR Y LIMITA EL POTENCIAL PRODUCTIVO DE LA PROGENIE**

El presente trabajo reúne resultados relativos a los efectos de la programación fetal por subnutrición sobre el desarrollo muscular en diferentes momentos de la vida y del ciclo productivo de ovinos, así como también describe efectos sobre variables productivas y de calidad de carne. Nuestros resultados demuestran que en condiciones extensivas de pastoreo de campo natural, una menor oferta de forraje asignada a ovejas gestantes puede inducir un determinado nivel de subnutrición que se manifiesta con efectos negativos sobre el desarrollo muscular desde los 70 días de vida intrauterina, se profundizan al momento del nacimiento y afectan luego la capacidad de crecimiento y de producción de carne, a la vez que inciden también sobre la calidad final del producto, sin importar que los animales posean las mejores capacidades ambientales para expresar su potencial de desarrollo y crecimiento posnatal.

Desde la perspectiva de la producción animal, nuestro trabajo tiene como aspecto resaltable el hecho de que los tratamientos experimentales se hayan realizado mediante el manejo de la oferta de forraje de campo natural y en condiciones extensivas. Esto es relevante dado que en Uruguay, así como también en los países más importantes en producción de carne ovina en el mundo, la mayoría de los corderos destinados a engorde provienen de rebaños de cría que son mantenidos durante la gestación en sistemas extensivos (Morris, 2017). De esta forma, nuestros resultados llaman la atención o alertan sobre la posibilidad de que ante determinadas condiciones y/o manejos nutricionales en sistemas extensivos se estén imponiendo limitaciones permanentes a las capacidades productivas de los corderos con destino a la faena y la producción de carne. Aún más, nuestro trabajo pone de manifiesto la importancia de la nutrición de la oveja gestante durante la primera mitad de la gestación. Esto es relevante porque si bien los efectos de una restricción nutricional intrauterina temprana sobre el peso al nacer pueden compensarse con un aumento del

plano nutricional durante el último tercio de gestación (Kenyon y Blair, 2014), nuestros resultados muestran que los efectos sobre el desarrollo muscular pueden perdurar y manifestarse de forma perjudicial en el futuro productivo del cordero, a pesar de que existan mejoras nutricionales tanto durante el final de la gestación como durante la vida posnatal.

## **6.2 ¿CÓMO SE EXPLICAN NUESTROS HALLAZGOS? IMPORTANCIA DEL MOMENTO Y DEL TIPO DE SUBNUTRICIÓN SOBRE EL DESARROLLO MUSCULAR**

Como se comentó durante la introducción de esta tesis (capítulo 1) existen múltiples trabajos en rumiantes que han evaluado efectos de programación fetal sobre variables de desarrollo muscular, desempeño productivo y calidad de carne, y a pesar de que algunos reportan efectos negativos significativos, varios han cuestionado la existencia de efectos o, al menos, propuesto que de existir dichos efectos, podrían ser escasos y compensarse con buenos niveles de alimentación maternal en el último tercio de gestación. Probablemente la razón por la cual nuestro trabajo indica efectos contundentes y evidenciables de forma sistemática en cada una de las etapas en las que fueron evaluados se deba a la naturaleza de la subnutrición generada, pastoreando campo natural, y también al momento en el que se aplicaron los tratamientos y a la su duración. Dichas diferencias quedan en evidencia cuando se observan las estimaciones en los balances proteicos y energéticos cubiertos por las dietas en ambos grupos experimentales a lo largo de los dos experimentos. Llama, sobre todo, la atención que en algunos períodos críticos para el desarrollo muscular las diferencias entre tratamientos en los balances nutricionales estimados fueron muy importantes y, además, más que nada los balances proteicos en las ovejas tratadas (grupos BOF) estuvieron muy lejos de cumplir con los requerimientos. En ese sentido, varios trabajos realizados tanto en rumiantes como en monogástricos han sugerido que los déficits proteicos y, en particular, de algunos aminoácidos pueden incidir de forma más marcada sobre el desarrollo muscular que las carencias exclusivamente energéticas. De acuerdo con lo revisado por Rehfeldt et al. (2011), las carencias proteicas en la dieta materna pueden afectar de forma negativa el

desarrollo muscular, sobre todo si ocurren durante las ventanas críticas para el proceso miogénico. Esto ha sido confirmado tanto en animales de laboratorio (Mallinson et al., 2007) como en suinos (Rehfeldt et al., 2008). De hecho, estos mismos autores demostraron en un experimento posterior que tras alimentar cerdas gestantes con dietas isoenergéticas pero contrastantes en sus aportes proteicos, los cerdos nacidos de madres con restricción proteica gestacional presentan menor cantidad de fibras musculares y menor contenido de ADN al nacer, y que estos efectos se extienden también hasta la edad de faena, comprobándose una menor capacidad para el desarrollo muscular posnatal (Rehfeldt et al., 2012).

Por otra parte, también se ha resaltado la influencia que pueden tener sobre el desarrollo muscular las diferencias dietarias en cuanto al aporte de algunos nutrientes específicos, como, por ejemplo, algunos ácidos grasos insaturados (Hurley et al., 2006) o ciertos aminoácidos (Oksbjerg et al., 2013). Estos aspectos pueden también contribuir a explicar nuestros hallazgos, dado que en condiciones de pastoreo extensivo es posible que diversos factores contribuyan a que existan diferencias nutricionales específicas entre los grupos experimentales. Concretamente, la selección de la dieta puede ser un factor que incida de forma relevante sobre la calidad de alimentación de un ovino en pastoreo. La selección de la dieta es una estrategia adaptativa que le permite al animal en pastoreo mejorar la cobertura de sus requerimientos nutricionales desde una pastura heterogénea (Soder et al., 2009). No obstante, la selectividad que presenta el ovino puede variar dependiendo de diversos factores como la cantidad de forraje ofertado por unidad de superficie (disponibilidad forrajera) o por animal (Hodgson, 1985) o la estructura del canopeo (Stobbs, 1973), determinando un efecto relevante sobre la cantidad y calidad de los nutrientes ingeridos. De ese modo, es posible especular que en las condiciones en las que se realizaron los experimentos (manejando ofertas de forraje contrastantes ajustadas con ovejas volantes) puedan haber existido diferencias en las oportunidades de selección que se tradujeran, a su vez, en diferencias más profundas o específicas en cuanto a algunos nutrientes particulares que también hayan incidido en los efectos observados.

Como se comentó antes, tanto el tipo de subnutrición como el momento en el que ocurra el déficit son claves para determinar o no efectos sobre el desarrollo

muscular y el desempeño productivo de la progenie. En ovinos, los trabajos recientes que no reportan efectos o que reportan efectos escasos se han concentrado, en general, en subnutriciones exclusivamente energéticas y en períodos más acotados (Piaggio et al., 2018, Luzardo et al., 2019), mientras que, en bovinos, varios trabajos que recientemente han reportado ya sea la ausencia de efectos de programación fetal o la presencia de efectos escasos sobre el desarrollo muscular y/o la producción de carne han evaluado los efectos de la subnutrición en la gestación media o tardía (Maresca et al., 2019, Webb et al., 2019, Ramírez et al., 2020, Gardner et al., 2021) pudiendo no haber incidido sobre la ventana crítica para la miogénesis fetal, la cual (como se comentó antes) ocurre más temprano durante la gestación. En las condiciones del presente trabajo, además de que puedan haber existido diferencias específicas en el tipo de restricción (diferencias entre el nivel de restricción energético y proteico dadas por el hecho de que el balance proteico estimado alcanzó un piso más bajo), también es posible que la ventana en la cual se produjo el mayor nivel de subnutrición haya coincidido con el momento crítico para la miogénesis secundaria. En el experimento 1 entre los días 25–58 y 59–70, las diferencias fueron importantes tanto para el balance energético (126 y 102 % vs. 83 y 74 %, AOF y BOF, respectivamente) como para el balance proteico (99 y 83 % vs. 70 y 67 %, AOF y BOF, respectivamente). Para el caso del experimento 2, las diferencias en los balances energéticos y proteicos fueron aún más marcadas: en los días 50 y 100 de gestación las estimaciones para los balances energéticos fueron 175 y 134 % vs. 122 y 69 %, y para los proteicos, de 117 y 78 % vs. 76 y 41 % para las ovejas controles y tratadas, en ambos períodos, respectivamente. A su vez, es de notar que (además de que, como se comentó antes, el nivel de restricción proteica alcanzó siempre un piso más bajo que el de restricción energética), en el día 50 los animales BOF cubrían sus requerimientos energéticos por encima del 100 %, pero no así sus requerimientos proteicos. Esto implica que, además de las eventuales diferencias entre balance proteico y energético que puedan haber existido para algunos períodos específicos, durante las etapas críticas para la miogénesis secundaria ovina (días 30-80 de gestación, aproximadamente; Wilson et al., 1992, Picard et al., 2002) las diferencias nutricionales fueron muy marcadas, pudiendo esto ser responsable de la intensidad

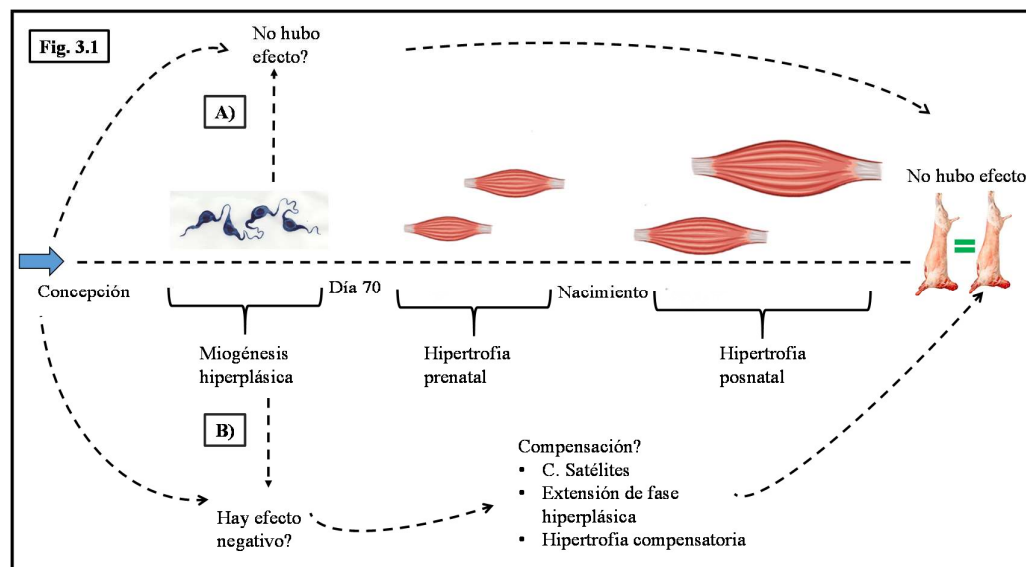
de los efectos luego evidenciados. Por otra parte, a pesar de que en ambos experimentos los niveles nutricionales aumentaron sobre el final de la gestación, en el primero probablemente el tiempo de aumento del plano nutricional (unos 23 días antes del parto) no fue suficiente para compensar y en el segundo, a pesar de que la oferta de forraje se aumentó considerablemente y se suplementó con afrechillo de arroz, los grupos se mantuvieron con ofertas de forraje diferentes, lo que pudo haber impedido que la compensación ocurriera. La naturaleza extensiva y pastoril de estos experimentos, así como los propios diseños experimentales específicos, no nos permiten determinar cuál de los factores terminó siendo el más decisivo o importante para los efectos observados. Por lo tanto, podría ser interesante el diseño de experimentos controlados en los que se pudiera determinar con mayor nivel de precisión qué factor termina incidiendo más sobre los efectos de programación fetal sobre el desarrollo muscular: la subnutrición y/o el tipo de subnutrición durante la ventana crítica para la miogénesis secundaria o la imposibilidad para compensar esos efectos durante la miogénesis hipertrófica.

De todos modos, podemos afirmar que en las condiciones de nuestros experimentos una menor oferta de forraje gestacional indujo efectos negativos de programación fetal sobre el desarrollo muscular evidenciables en diferentes etapas del desarrollo, los cuales probablemente se debieron a la intensidad, el momento y la duración de la subnutrición inducida.

### **6.3 PROGRAMACIÓN FETAL POR SUBNUTRICIÓN EN LA MIOGÉNESIS OVINA: APOORTE DE NUESTROS RESULTADOS A UN POSIBLE MODELO EXPLICATIVO**

Tal cual acabamos de comentar, nuestros resultados arrojan información valiosa en relación con la existencia de efectos de la programación fetal por subnutrición sobre el desarrollo muscular y permiten saber que con los manejos nutricionales planteados en nuestros experimentos existen efectos negativos durante la miogénesis hiperplásica fetal que además perduran y se manifiestan en menores capacidades para el desarrollo posnatal al momento del nacimiento. En la figura 3 se esquematiza el aporte de nuestros resultados a un posible modelo teórico que

explique los efectos de programación fetal sobre el desarrollo muscular ovino. Se resaltan las diferencias entre aquellos experimentos en los cuales se evalúan los efectos exclusivamente en etapas finales del ciclo productivo y en los que, por lo tanto, no se puede conocer si la ausencia de efectos en animales a la faena se debe a la falta de efectos durante la miogénesis hiperplásica o a la compensación hipertrofica, en contraposición con nuestro diseño que, a pesar de incluir dos experimentos independientes que lógicamente muestran diferencias metodológicas, involucra muestreos en diferentes etapas del desarrollo que permiten establecer asociaciones teóricas que contribuyen a explicar cómo impacta la subnutrición gestacional sobre la miogénesis ovina.



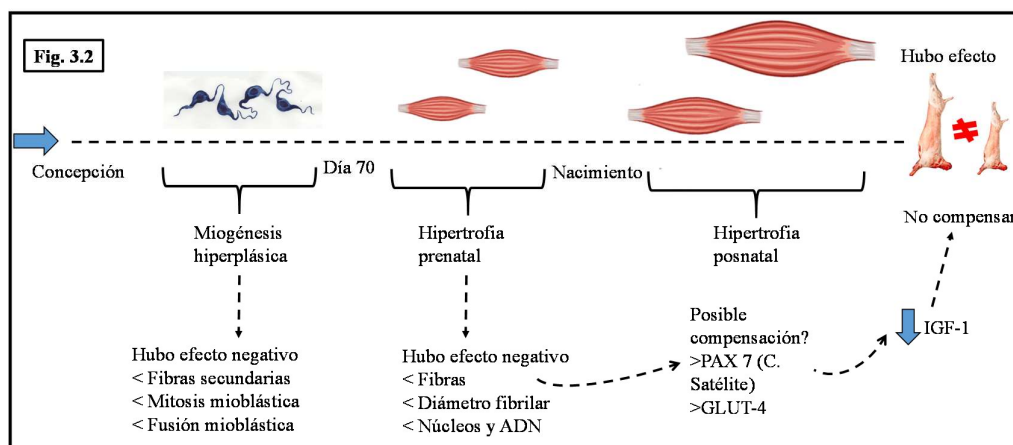


**Figura 3:**

Esquema ejemplificando posibles modelos explicativos para el hallazgo o no de efectos de programación fetal sobre el desarrollo muscular en animales de producción.

En la figura 3.1 se muestra la situación en la cual no se observan efectos en etapas posnatales. El esquema señala cómo en esta situación el no detectar efectos puede deberse tanto a la ausencia de efectos sobre la miogénesis hiperplásica fetal (A) como a la compensación de los efectos no detectados durante la fase hipertrófica fetal o posnatal (B).

En la figura 3.2 se muestra la situación planteada en nuestros experimentos, en los que se evidencian efectos en etapas avanzadas del desarrollo (capítulos 4 y 5). En este caso hay certeza de que hubo efectos sobre la miogénesis hiperplásica fetal (menos fibras fetales secundarias formadas a los 70 días, menos actividad mitótica y de fusión mioblástica en algunos músculos; capítulo 2). Hay certeza de que los efectos perduraron hasta el nacimiento (menos fibras, menos núcleos, menos ADN) y de que, a pesar de que hubo indicios de una posible compensación perinatal (más PAX 7 o células satélite y más GLUT-4), hubo un fuerte indicador de que esa compensación pudo estar severamente limitada por el ambiente endócrino local (menos IGF-1 en músculos de neonatos) (capítulo 3). Este modelo permite especular que ambas situaciones combinadas sean determinantes de los efectos observados luego en el experimento 2 (animales que crecieron más lento y produjeron menos carne; capítulo 4). No obstante, resta por saber si la falta de compensación prenatal se debe a la profundidad de los efectos durante la miogénesis fetal o a la falta de un aporte nutricional adecuado (en tiempo y forma) que permitiera dicha compensación.

En concreto, nuestros resultados indican que la subnutrición inducida con una menor oferta de campo natural afecta la miogénesis hiperplásica fetal manifestándose con menos fibras fetales secundarias formadas, así como también menor actividad mitótica y de fusión mioblástica. Nos permiten saber, además, que si la subnutrición continúa hasta poco más de veinte días antes del parto, los músculos de los animales subnutridos presentarán signos de imposibilidad para compensar los efectos tempranos, con un menor diámetro fibrilar, menor densidad fibrilar, menor contenido de ADN y menor número promedio de núcleos por fibra. A su vez, sabemos también que en ese momento los animales subnutridos podrían presentar mejores oportunidades para compensar mediante hipertrofia posnatal, dado que hay mayor expresión de PAX 7 (equivalente a una mayor cantidad de células satélite activas) y de GLUT-4 (equivalente a una mejor capacidad para captar glucosa). Sin embargo, dicha compensación estaría muy limitada por la marcada reducción en los niveles locales de IGF-1, que juegan un rol decisivo para la hipertrofia mediada por células satélite.

Es importante resaltar, a su vez, que, como se comenta en la discusión de cada una de las publicaciones (capítulos 2, 3, 4 y 5) de la tesis, muchos de los efectos específicos observados en las diferentes etapas son consistentes con reportes previos. Por ejemplo, nuestro hallazgo de efectos importantes sobre la miogénesis secundaria o la actividad mitótica mioblástica fetal acompañan hallazgos realizados en experimentos controlados en diferentes especies (Zhu et al., 2004, Tilley et al., 2007, Gauvin et al., 2020). Lo mismo ocurre para los menores contenidos de ADN, los menores diámetros fibrilares o las mayores actividades de PAX 7 o GLUT 4 en músculos de neonatos, los cuales también son consistentes con hallazgos realizados en experimentos controlados o incluso en modelos *in vitro* en diferentes especies (Greenwood et al., 1999, Costello et al., 2008, Yates et al., 2014; Chang et al., 2020). No obstante, nuestro enfoque con la inclusión de diferentes puntos y/o momentos de muestreo permite de algún modo consolidar la información y proponer una idea general de cómo podría incidir una subnutrición prenatal sobre el desarrollo muscular ovino, y de cómo podrían sucederse temporalmente los efectos en diferentes momentos claves del desarrollo.

Otro de los aspectos importantes en los cuales nuestro trabajo hace un aporte original es en demostrar que los efectos de programación fetal sobre el desarrollo muscular pueden variar dependiendo del músculo involucrado. Como se comentó durante la revisión bibliográfica, ya existía abundante literatura que indicaba que una subnutrición prenatal puede afectar de forma diferente a distintos músculos de la canal y que ello podía depender tanto de la proporción de fibras fetales secundarias como de las características fibrilares maduras o de las diferencias temporales en el desarrollo de cada músculo. En ese sentido, nuestro trabajo hace un aporte interesante al demostrar que a los 70 días de desarrollo, la actividad mitótica mioblástica fue marcadamente diferente entre los distintos músculos evaluados y que, como se discute en el capítulo 2, ello podría incidir en el hallazgo o no de efectos del tratamiento nutricional sobre la expresión de PCNA en los músculos fetales. En la figura 4 se ejemplifica cómo diferentes músculos evaluados podrían estar atravesando etapas miogénicas distintas al momento en el que fueron muestreados. Tal cual se muestra en el esquema, es posible simplificar la situación y definir 3 escenarios diferentes: 1.- algunos músculos que al momento del muestreo se encontraban con una actividad mitótica intensa, como el *psaos major* y el *semitendinosus*, 2.- algunos músculos en los que la actividad mitótica era notoriamente baja, como el *gluteobiceps* y 3.- otros que se ubicaban en un punto intermedio, como el *semimembranosus*, *gluteus medius* y el *longissimus lumborum*. Esto se puede interpretar de diferentes maneras, ya sea asumiendo que aquellos músculos con menor actividad mitótica ya han atravesado el apogeo de su fase hiperplásica, o bien la situación opuesta, es decir, que estos músculos no han alcanzado aún el máximo nivel de mitosis mioblástica.

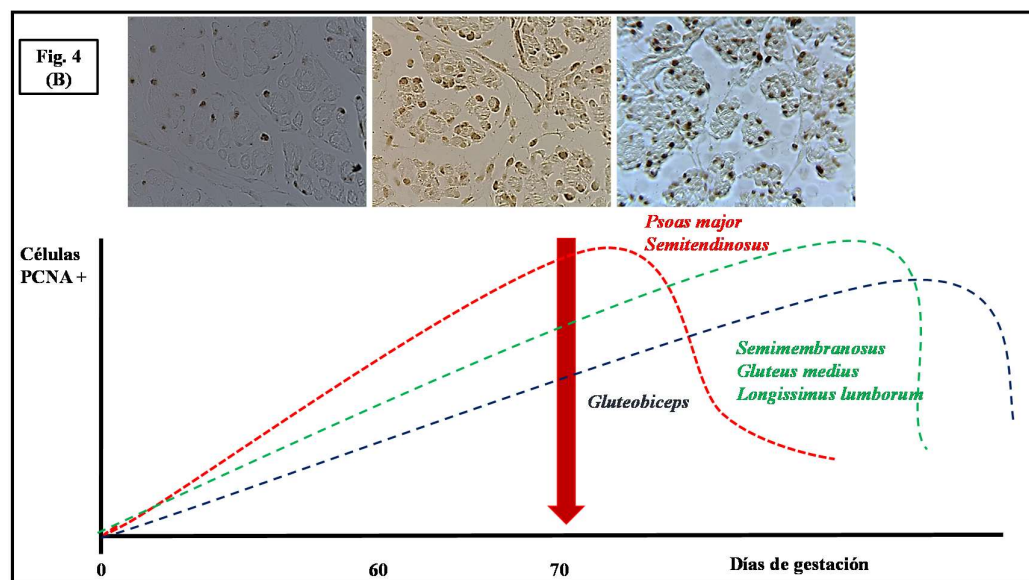
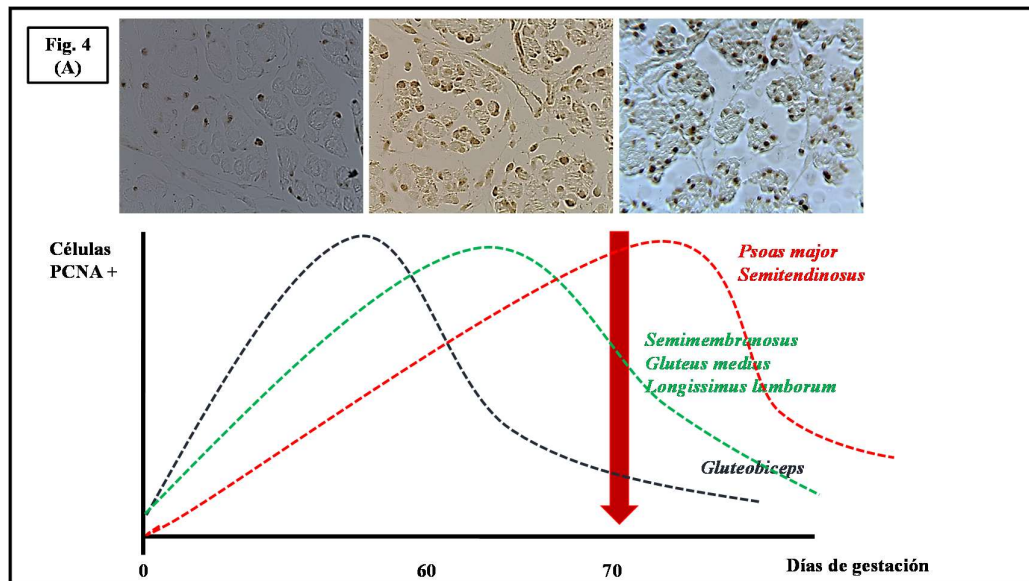


**Figura 4:**

Esquema ejemplificando posibles modelos explicativos para el hallazgo de diferentes niveles de actividad mitótica mioblástica en distintos músculos de fetos de 70 días.

En la figura A se muestra la situación en la cual los músculos *psoas major* y *semitendinosus* al día 70 (momento del muestreo) estarían experimentando el pico mitótico mioblástico, mientras que los otros músculos habrían ya atravesado el pico y su actividad hiperplásica se encontraría en declive o casi finalizada en el momento del muestreo.

En la figura B se ejemplifica la otra posibilidad, en la cual los músculos que al momento del muestreo mostraron menor cantidad de células PCNA positivas podrían estar en etapas previas (con diferente nivel de avance dependiendo del músculo) a su apogeo mitótico.

A su vez, como fue discutido en el capítulo 2, esto también permite plantear una posible explicación para el hallazgo de mayores expresiones de PCNA en algunos músculos de fetos no restringidos (AOF). Esta alternativa explicativa se ejemplifica en la figura 5, donde se muestra cómo el hallazgo de más células en mitosis en músculos de fetos AOF puede deberse ya sea a una extensión en la duración de la fase hiperplásica mitótica en estos animales o a un abandono prematuro de la fase mitótica en los músculos de los fetos BOF.

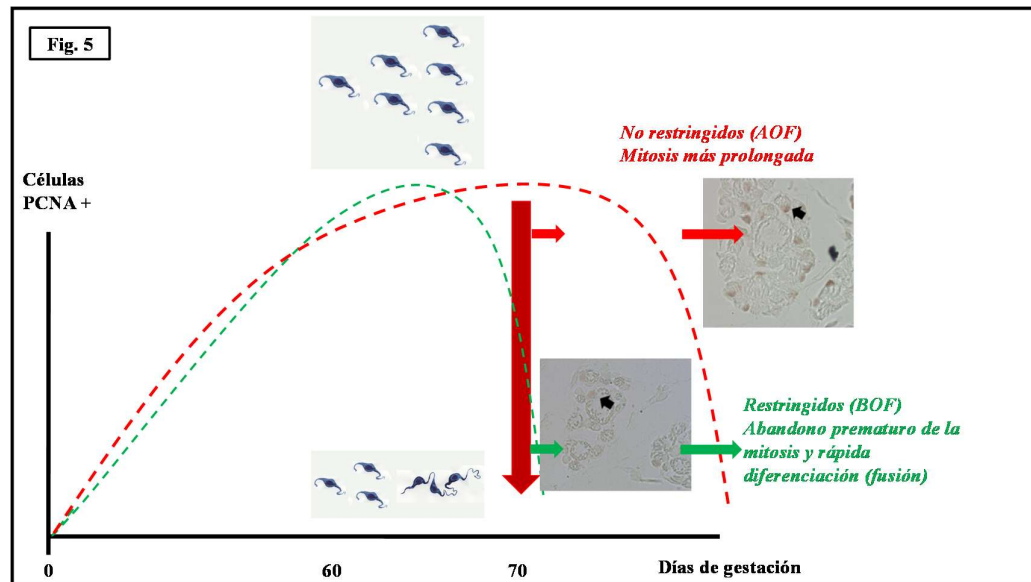


**Figura 5:**

Esquema ilustrativo de cómo el hallazgo de mayor actividad mitótica en músculos de animales AOF puede deberse a una extensión de la fase mitótica en estos animales que determine que a los 70 días los mioblastos todavía estén con una elevada tasa de mitosis, mientras que en este mismo momento en los músculos de los animales BOF la mayoría de los mioblastos ya han abandonado el ciclo celular para progresar hacia la fusión y diferenciación.

Como fue desarrollado en el capítulo 1, se sabe que durante la miogénesis hiperplásica existe una delicada regulación que define la permanencia o el abandono del ciclo celular por parte de los mioblastos (Kitzmann y Fernandez, 2001) y que

muchos de los factores que la regulan son susceptibles a los efectos de la programación fetal (Chang et al., 2020). Es importante destacar, además, que esta teoría acompaña lo sugerido por algunos hallazgos en suinos, que indican que cambios en el estatus nutricional durante el desarrollo muscular fetal podrían retrasar la diferenciación mioblástica, permitiendo una extensión en la fase hiperplásica que aumente la cantidad de precursores fibrilares formados (Kalbe et al., 2013, Zou et al., 2016, Zou et al., 2017). De acuerdo con Kalbe et al. (2013), la suplementación con arginina durante la gestación temprana estimula la proliferación y retrasa la diferenciación mioblástica en músculos de fetos suinos de 75 días de desarrollo. Algo similar fue también reportado por Zou et al. (2016), quienes demostraron que en suinos, un aumento en los niveles energéticos dietarios desde la concepción hasta el día 90 de gestación retrasa la diferenciación miogénica en músculos de fetos de 90 días de desarrollo.

En síntesis, podemos afirmar que nuestros resultados aportan a una posible explicación para el hallazgo de diferencias intermusculares en los efectos de programación fetal en diferentes momentos del desarrollo, sugiriendo que las diferencias temporales en la miogénesis fetal podrían ser uno de los factores involucrados en estos hallazgos.

#### **6.4 PROGRAMACIÓN FETAL POR SUBNUTRICIÓN: IMPACTO SOBRE LA DIVERSIDAD FIBRILAR**

Los resultados de la presente tesis indican que la subnutrición inducida por una menor oferta de forraje de campo natural en las condiciones planteadas por nuestros experimentos incide en la composición fibrilar tanto al nacimiento (capítulo 3) como a los 200 días de vida (capítulo 5). Concretamente, nuestros resultados señalan que los neonatos nacidos de ovejas subnutridas presentan músculos con más fibras lentas y que esa característica, en general, se mantiene en los músculos de los animales a los 200 días de vida, cuando presentan músculos mayormente más oxidativos. Estos hallazgos son importantes porque indican que la composición fibrilar tanto al nacer como hasta el final del ciclo productivo de corderos pesados es susceptible a efectos de programación fetal por subnutrición. De hecho, estos

cambios podrían incidir y/o contribuir a explicar las diferencias entre animales BOF y AOF tanto en términos de sus capacidades de crecimiento como de las características de su carne. Por ejemplo, (como se resume en la figura 6) es muy importante destacar que una mayor presencia de fibras lentas al nacer, así como una mayor presencia de fibras oxidativas a la faena, pueden contribuir a explicar las diferencias en el desempeño productivo entre animales y en la masa muscular a la faena, ya que las fibras lentas y oxidativas son las que presentan menores capacidades individuales para la hipertrofia posnatal (Lefaucheur, 2010). Por lo tanto, es esperable que animales con más fibras lentas y oxidativas presenten peor desempeño en el engorde y músculos más livianos a la faena, hecho que fue comprobado en los corderos BOF en el experimento 2 (capítulo 4).

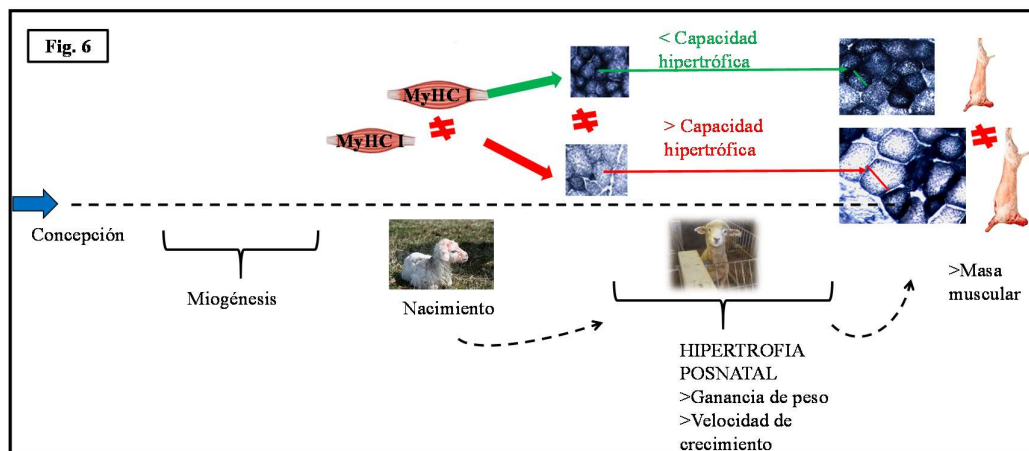


**Figura 6:**

Esquema ejemplificando cómo los hallazgos descritos en el capítulo 3 (mayores expresiones de MyHC I en neonatos BOF) y 5 (mayores cantidades de fibras oxidativas en corderos pesados BOF) pueden vincularse y explicar las diferencias en el desempeño productivo de los animales BOF y AOF descritas en el capítulo 4 (ganancias más bajas y músculos más livianos en corderos pesados BOF).

Por otra parte, como se desarrolló en el capítulo 1, existen, en general, diferentes posturas en relación con qué tipo de cambios ejerce la subnutrición prenatal sobre la composición fibrilar. En ese sentido, es importante destacar que nuestros hallazgos acompañan la idea de varios reportes previos indicando que los músculos de animales recién nacidos que padecieron RCIU muestran mayores cantidades de fibras lentas y oxidativas tanto en ovinos (Fahey et al., 2005) como en

suinos (Bauer et al., 2000 y 2006) o caprinos (Zhou et al., 2021). Lo mismo ocurre con nuestros resultados en relación con los cambios fibrilares evidenciados en corderos pesados: son consistentes con trabajos previos que indican que los músculos de animales gestados por madres subnutridas presentan más fibras lentas y oxidativas, cuestión que ha sido demostrada tanto en ovinos (Tygesen et al., 2007, Piaggio et al., 2018) como en bovinos (Mohrhauser et al., 2015), caprinos (Zhou et al., 2021), conejos (Dalle Zotte et al., 2005) y roedores de laboratorio (Toscano et al., 2008). Es importante resaltar también que, dado que las características fibrilares son plásticas y pueden variar a lo largo de la vida posnatal (Lefaucheur y Gerrard, 2000), es importante el aporte que nuevamente hacen nuestros trabajos en el sentido de demostrar cómo aquellos cambios evidenciados al nacer perduran (en un mismo sentido biológico) hasta etapas más avanzadas del desarrollo. Este es, a nuestro entender, un aporte interesante, sobre todo si se considera que mucha de la controversia en relación a cómo impacta la programación fetal sobre la diversidad fibrilar está afectada por la comparación de resultados contrastantes derivados de trabajos que evalúan el impacto en diferentes momentos del desarrollo (fetos a término, neonatos o animales de diferentes edades más avanzadas). En ese sentido, nuestros resultados son claros e indican que (en las condiciones planteadas en nuestros experimentos y considerando, además, que los resultados provienen de dos experimentos independientes, similares, pero con diferencias metodológicas) los animales subnutridos nacen, en general, con músculos más lentos y oxidativos y esas características perduran hasta la faena.

Como se comentó en el capítulo 1, estos cambios fibrilares pueden, además, no solo implicar cambios en el desempeño productivo de los animales, sino también incidir fuertemente en sus capacidades metabólicas y en su salud. Nuestros resultados podrían estar indicando, a su vez, que aquellos animales que padecieron RCIU podrían presentar menor capacidad muscular de captación de glucosa, principalmente por causa de una menor masa muscular corporal y no por la presencia de mayores proporciones de fibras rápidas y glicolíticas. Esto estaría en sintonía con lo planteado por una serie de investigadores (Ozanne et al., 1996, Agote et al., 2001, De Freitas et al., 2003, Costello et al., 2008), quienes en diversas especies han

propuesto que la menor capacidad para responder a la insulina y captar glucosa en el músculo esquelético de animales que padecieron RCIU se debe, principalmente, a una masa muscular reducida y no a la presencia de más fibras rápidas y glicolíticas.

Por otra parte, es importante destacar que los resultados de la presente tesis también contribuyen, al menos en parte, a desarrollar un modelo explicativo para los cambios fibrilares observados. Esencialmente, como se esquematiza en la figura 7, el aporte de nuestros trabajos pasa una vez más por la inclusión de diferentes momentos de muestreo a lo largo del desarrollo, que permiten asociar los cambios observados en etapas prematuras del desarrollo con aquellos observados en animales al final de su ciclo productivo. Como se comentó durante el capítulo 1 y se resume en la figura 7, existen varios factores que se han propuesto como posibles causas de los cambios fibrilares evidenciados tras el RCIU. Estos son: la disminución en la cantidad de fibras fetales secundarias formadas y el impacto posterior sobre la diferenciación de estas (Picard et al., 2002), las diferencias en la expresión de algunos MRF (Hughes et al., 1993, Lefaucheur y Gerrard, 2000) y las diferencias en los niveles de algunas hormonas como las hormonas tiroideas y su impacto en la diferenciación fibrilar (Bauer et al., 2003). Obviamente, nuestro trabajo no incluyó una estrategia para evaluar el impacto de cada uno de estos posibles factores en cada etapa del desarrollo. No obstante, sí realiza un aporte valioso al demostrar una posible conexión entre el hallazgo de menos fibras secundarias fetales, más expresión de MyHC tipo I en neonatos y más fibras oxidativas en corderos de 200 días.

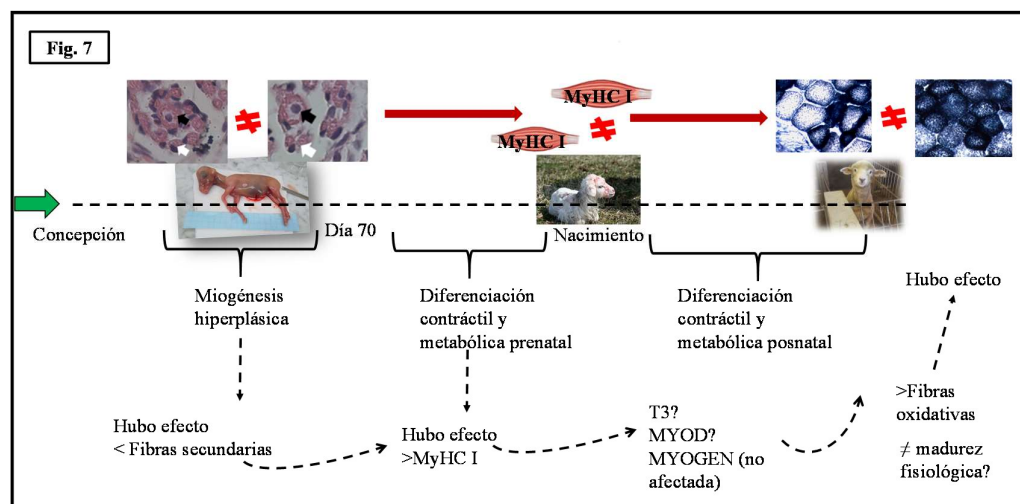


**Figura 7:**

Esquema de un posible modelo explicativo para el hallazgo de cambios fibrilares tras la subnutrición prenatal en corderos pesados. La figura resume cómo el hallazgo de menos fibras secundarias en animales BOF a los 70 días (capítulo 2) podría repercutir en el hallazgo de más MyHC I en neonatos BOF (capítulo 3), lo cual también es asociable al hallazgo de más fibras oxidativas en los músculos de corderos pesados del grupo BOF (capítulo 5). El esquema muestra, además, cómo queda por dilucidar si otros factores como las diferencias en los niveles de T3 o MYOD (no miogenina, la cual no fue afectada por los tratamientos al nacimiento) o diferencias en los niveles de madurez fisiológica al momento del muestreo puedan haber incidido también en los hallazgos.

En resumen, los resultados de la presente tesis indican que una subnutrición materna inducida por una menor oferta de forraje de campo natural afecta la composición fibrilar en músculos esqueléticos tanto al nacimiento como al momento de la faena, de forma tal que los músculos de los animales restringidos se muestran, en general, más lentos y oxidativos. Estos hallazgos permiten especular, además, que las diferencias en la composición fibrilar puedan haber incidido en las menores capacidades de crecimiento posnatal y la masa muscular reducida observada en los corderos BOF. Asimismo, nuestros resultados sugieren que una reducción en la cantidad de fibras fetales secundarias formadas durante la miogénesis hiperplásica fetal podría ser una de las principales causas de los cambios fibrilares observados al nacer y al momento de la faena.

## **6.5 PROGRAMACIÓN FETAL POR SUBNUTRICIÓN. IMPACTO SOBRE LA CALIDAD DE LA CARNE**

Dada la relevancia que posee el tejido muscular estriado esquelético y su diversidad para la calidad de la carne, la presente tesis también se propuso evaluar en qué medida los cambios en el desarrollo muscular podrían evidenciarse como diferencias en distintos atributos de calidad de la carne. En ese sentido, nuestros resultados demuestran que diferentes variables de calidad de carne como el nivel de pH, el color instrumental, la capacidad de retención de agua o la ternura instrumental pueden verse afectadas en corderos pesados por la subnutrición gestacional. Sin embargo, muchos de estos efectos parecen, de algún modo, ser menos claros o más

difíciles de interpretar que los cambios observados en la composición fibrilar, ya que en su mayoría variaron, por ejemplo, en función del sexo de la progenie o del músculo evaluado. La principal dificultad para interpretar y obtener conclusiones contundentes en relación con los efectos de programación fetal sobre la calidad de carne está vinculada con la enorme complejidad en la definición de estas variables. En primer lugar, ya resulta de por sí muy difícil la propia definición y/o caracterización de la calidad de la carne en sí misma. El concepto de calidad de la carne es un término complejo y subjetivo que, además, puede adquirir valoraciones disímiles o incluso contrapuestas dependiendo de cuál sea el actor de la cadena cárnica que lo evalúe. Desde el punto de vista del consumidor, la calidad de la carne incluye, por un lado, aspectos extrínsecos que van más allá de los atributos palpables propios del producto y, por otro lado, aspectos intrínsecos que están directamente vinculados a las características físicas y químicas definidas por la propia composición o naturaleza biológica del producto (Becker, 2000, Bredahl, 2004). Los aspectos más relevantes que hacen a la calidad intrínseca de la carne son el color, la jugosidad, la terneza y el sabor (Lawrie y Ledward, 2006). A su vez, la valoración de estos aspectos cualitativos intrínsecos de las carnes puede realizarse mediante diferentes metodologías instrumentales con precisión y repetitividad, aunque, dado que la percepción cualitativa de la carne deriva de una compleja interacción de factores sensoriales y físicos, la incorporación de evaluaciones sensoriales es estrictamente necesaria para la caracterización completa de la calidad de la carne (Nute, 2002).

Por otra parte, los diferentes atributos de la calidad de la carne son el resultado de complejas interacciones entre diversos aspectos intrínsecos musculares (composición, metabolismo y características morfológicas de los distintos componentes estructurales del músculo) y extrínsecos o ambientales (aspectos fisiológicos, susceptibilidad al estrés, condiciones de manejo, condiciones de procesamiento tecnológico, etc.) (Ouali et al., 2006, England et al., 2013). A su vez, la influencia relativa que posea uno u otro de estos factores va a depender tanto del atributo de calidad al que nos estemos refiriendo como del músculo que estemos evaluando. La mayoría de los aspectos de calidad de la carne, como la capacidad de

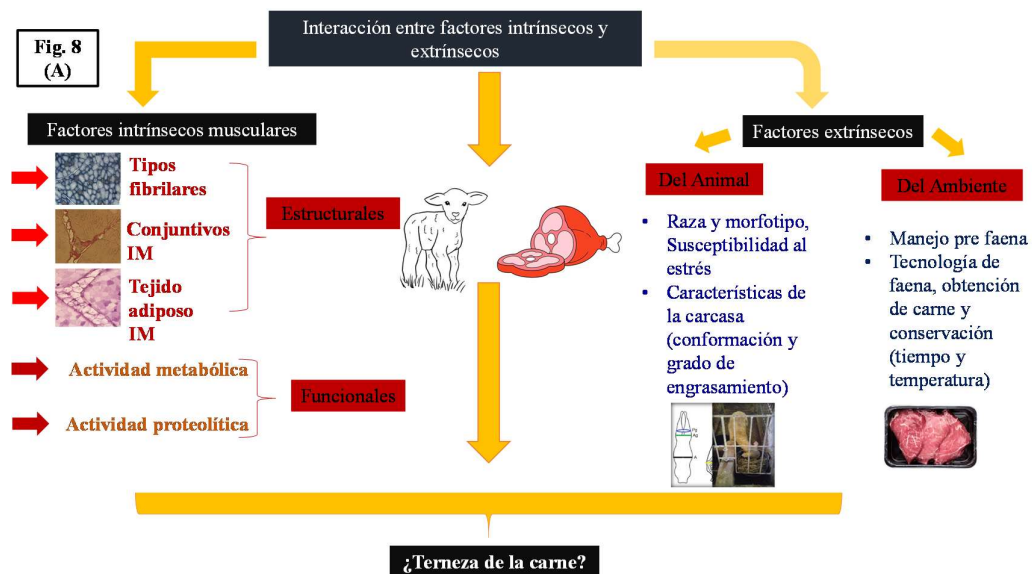
retener agua, el color o la terneza, se definen a lo largo del proceso de transformación de músculo en carne y son producto de la interacción entre el metabolismo muscular y el ambiente en el que se desencadenan las reacciones. Estos procesos están, a su vez, muy afectados por diversos factores fisiológicos animales y por el ambiente, y se sabe que esta transformación no ocurre de igual forma entre los diferentes músculos de la canal (Ouali et al., 2006, England et al., 2013).

A su vez, de los factores intrínsecos musculares que inciden sobre la calidad de la carne se sabe que todos ellos pueden ser afectados por el ambiente intrauterino, pero que, al mismo tiempo, esa influencia puede variar dependiendo del músculo involucrado. Como se comentó en el capítulo 1, el estatus nutricional de la hembra gestante puede afectar el desarrollo de los tejidos muscular, adiposo y conjuntivo intramusculares (Du et al., 2015), pudiendo afectar la calidad de la carne a través de modificaciones en cualquiera de estos tres componentes. Como si fuera poco, existe, además, en la bibliografía cierto grado de controversia en cuanto a cómo inciden algunos aspectos intrínsecos específicos sobre la calidad de la carne. Esto ocurre, por ejemplo, para el caso de la terneza de la carne y la composición fibrilar: hay reportes que indican que una mayor abundancia de fibras lentas y oxidativas empeoran la terneza al incidir en menores tasas proteolíticas debidas a mayores actividades calpastatínicas (Ouali y Talmant, 1990, Sazili et al., 2005) y, por otro lado, reportes que indican que una mayor presencia de fibras rápidas y glicolíticas empeoran la terneza por presentar mayores diámetros y tender a generar un exceso de lactato en músculos *post mortem* (Maltin et al., 1998 y 2003). Más aún, es posible que esta controversia se deba al modo cómo los diferentes factores intrínsecos que inciden en la calidad de la carne varían dependiendo del músculo evaluado. De hecho, nuestro propio equipo ha demostrado que en el caso específico de los tipos fibrilares, los vínculos entre ellos y la calidad de la carne dependen de los músculos involucrados (Ithurralde et al., 2018, Ithurralde et al., 2020). Por lo tanto, es evidente que resultará extremadamente complejo detectar e interpretar de forma precisa cómo incide la programación fetal por subnutrición sobre la calidad de la carne.

Esta realidad es muy notoria cuando se revisa la información disponible en la literatura en la que, como se discutió en profundidad en el capítulo 1, abundan, por

ejemplo, los reportes inconsistentes entre sí. Probablemente, parte de la ausencia general de efectos reportada en la bibliografía o de la presencia de efectos escasos o contradictorios se deba a la variabilidad entre trabajos en los diseños de los tratamientos que puedan implicar efectos o no sobre el desarrollo de los tejidos que componen la carne, a no considerar otros factores como el sexo de la progenie o el músculo o a no incluir variables de composición muscular que involucren, por ejemplo, aspectos morfológicos tisulares, entre otros. De todos modos, y a pesar de la complejidad antes descrita, como se discute en los capítulos 4 y 5, nuestros resultados puntuales pueden aportar al conocimiento básico de cómo la programación fetal por subnutrición puede incidir sobre algunas variables de calidad de carne y de cómo algunos de los efectos observados pueden explicarse por diferencias en variables de composición muscular.

La figura 8 pretende ser un resumen simplificado de algunos posibles factores intrínsecos y extrínsecos que inciden en la terneza de la carne (A) y de cómo podemos vincular algunos de nuestros hallazgos de composición muscular (factores intrínsecos) con los efectos detectados en la terneza instrumental de la carne (B).



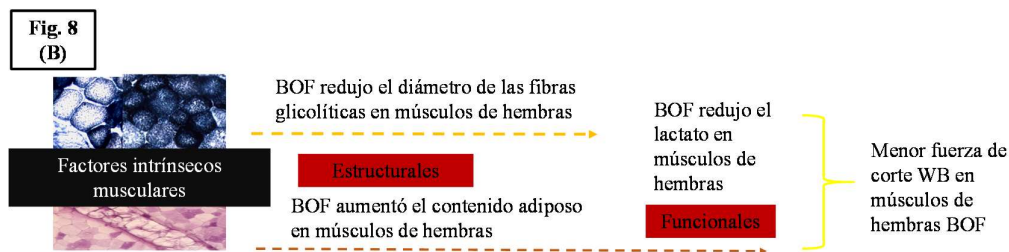


**Figura 8:**

Representación esquemática de la combinación de factores intrínsecos musculares y extrínsecos (del animal y del ambiente) que pueden afectar la terneza de la carne. En la figura B se resume cómo algunos efectos de programación fetal detectados para algunos factores intrínsecos pueden contribuir a explicar el hallazgo de carnes más tiernas en animales BOF.

Como se ejemplifica en la figura 8, la terneza puede ser afectada por diversos factores propios de la composición muscular, así como por factores propios del animal, pero ajenos a las características musculares, o incluso por factores ambientales ajenos al animal. En la parte B de la figura se destaca cómo nuestros hallazgos para algunos factores intrínsecos musculares (composición fibrilar y contenido adiposo) pueden contribuir a explicar el hallazgo de carnes más tiernas en animales BOF. La subnutrición materna produjo una reducción selectiva en la cantidad de fibras glicolíticas de gran diámetro en músculos de hembras. Esto contribuye a explicar el hallazgo de carnes más tiernas dada la asociación negativa que se ha descrito entre un mayor contenido de fibras rápidas y glicolíticas de gran diámetro y la terneza de la carne tanto en ovinos (Solomon y Lynch, 1988, Ithurralde et al., 2018) como en bovinos (Maltin et al., 1998). A su vez, la reducción en los niveles de lactato que se observó en músculos de hembras BOF también puede contribuir a explicar las mejoras en la terneza de la carne de estos animales, ya que se ha descrito que las fibras rápidas y glicolíticas de gran tamaño normalmente se asocian con peor calidad por causa de un exceso en el contenido muscular de lactato (Maltin et al., 2003). Por otra parte, la subnutrición materna también demostró ser capaz de afectar otro factor intrínseco muscular al aumentar selectivamente el contenido lipídico en músculos de hembras BOF. Este es otro factor que pudo haber contribuido al hallazgo de carne más tierna en animales BOF, ya que normalmente se

acepta que mayores contenidos de lípidos intramusculares favorecen la terneza de la carne (Shackelford et al., 1994, Dickeman et al., 2005, Christensen et al., 2011). Es importante destacar, además, que el hallazgo de carnes más tiernas en músculos de hembras BOF es consistente con algunos reportes previos que demostraron que una peor nutrición gestacional determinaba la presencia de carne más tierna tanto en bovinos (Mohrhauser et al., 2015, Gardner et al., 2021) como en ovinos (Krausgrill et al., 1999) y suinos (Rehfeldt et al., 2012, Oskesberg et al., 2013).

En síntesis, queda en evidencia con los esquemas antes planteados que nuestro trabajo realiza un aporte al conocimiento de las bases que operan detrás de los posibles efectos de programación fetal sobre la calidad de la carne. A pesar de la complejidad que caracteriza a las variables de calidad de carne, nuestros hallazgos permiten establecer asociaciones entre efectos de programación fetal sobre la composición muscular y efectos sobre algunos atributos de calidad de la carne.

## **6.6 EFECTOS SEXO-DEPENDIENTES DE PROGRAMACIÓN FETAL POR SUBNUTRICIÓN: APORTE DE NUESTROS RESULTADOS**

Otro de los aspectos en los que la presente tesis realiza aportes novedosos es el hallazgo de diversos efectos sexo-dependientes de programación fetal, los cuales incluyeron efectos sobre el crecimiento, el desempeño productivo, la masa muscular y la calidad de la canal (capítulo 4), así como también sobre variables de composición muscular, tipos de fibras y calidad de carne (capítulo 5). Como se desarrolló en el capítulo 1, estos hallazgos son muy importantes dado que, si bien existían diversos reportes que demostraban efectos sexo-dependientes de programación fetal para el desarrollo de diversos trastornos y enfermedades, la consideración del sexo de la progenie a la hora de evaluar efectos de programación fetal en animales de producción no es una cuestión demasiado difundida. Por lo tanto, nuestros resultados alertan acerca de la importancia de incluir al sexo como un factor decisivo a la hora de interpretar los efectos de programación fetal en animales productivos y sugieren, también, que, tal vez, la falta de efectos o la aparición de efectos contradictorios en reportes previos pueda deberse a no haber considerado el factor sexo en el análisis de los resultados.

Por otra parte, más allá de los hallazgos de efectos sexo-dependientes concretos, nuestro trabajo también contribuye a un posible modelo explicativo de estos hallazgos. Como se desarrolló en el capítulo 1, para el caso de los efectos sexo-dependientes vinculados a la susceptibilidad a ciertas enfermedades, se ha propuesto que estos podrían tener como base biológica la influencia de las hormonas sexuales en la regulación de algunos mecanismos fisiológicos, como, por ejemplo, la regulación de la presión arterial. Sin embargo, en nuestro estudio algunos hallazgos específicos en los efectos de la subnutrición sobre los pesos corporales, las variables sanguíneas y la producción de leche de las ovejas nos permiten especular otra posible explicación para los hallazgos sexo-dependientes observados. Como se discute en el capítulo 4, el hecho de que la menor oferta de forraje haya afectado de forma distinta la evolución del peso corporal, la concentración de glucosa en sangre y la producción de leche en las madres que gestaron hembras o machos nos permite especular que nuestros hallazgos están relacionados con el desarrollo de una estrategia evolutiva que tiene como finalidad la protección de la progenie femenina ante situaciones ambientales restrictivas. Como se discute en el capítulo 4, esta especulación es consistente con una teoría ampliamente aceptada que fuera desarrollada por Trivers y Willard (1973).

La hipótesis de Trivers y Willard (1973) estableció que en aquellas situaciones en las que un sexo exhibe más variabilidad en su valor reproductivo o más variabilidad en su probabilidad de éxito reproductivo, las madres en buenas condiciones ambientales preferirán a la progenie de ese sexo, mientras que las madres en malas condiciones preferirán al sexo opuesto. En las especies polígamas el sexo con mayor variabilidad en el éxito reproductivo es el masculino por la simple razón de que entre los machos la probabilidad de aparearse es más variable y depende de múltiples atributos individuales como el vigor, el tamaño corporal, la dominancia, etc. Entre los aspectos que hacen a dicha preferencia se incluye lo que se define como la inversión de los padres, que implica que las madres en peores condiciones invertirían más en proteger a su progenie femenina. Desde el establecimiento de esta teoría, esta ha sido ampliada a diversas especies, incluso a la propia especie humana. Por ejemplo, Fujita et al. (2012) reportaron que las mujeres

de bajo estatus socioeconómico en las villas agropastorales del norte de Kenia producen leche materna con mejor composición nutritiva cuando amamantan niñas que cuando amamantan varones, mientras que en madres de estratos socioeconómicos altos esta realidad se invierte. De ese modo, como se ejemplifica en la figura 9, nuestros hallazgos en relación con cómo fueron afectadas las madres del experimento 2 en términos de peso corporal (corregido por peso de vellón y estimación de peso fetal) y producción de leche durante la lactancia pueden relacionarse con la teoría de Trivers y Willard y aportar a la explicación de varios de los efectos sexo-dependientes observados en la prole. En concreto, como se muestra en la figura 9 y se detalla en el capítulo 4, las ovejas BOF que gestaron y criaron corderas sufrieron pérdidas mayores y más prematuras en su peso corporal durante la gestación que pudieron implicar mayores movilizaciones corporales a favor de proteger su prole femenina. Esto, a su vez, se acompañó luego de mejores producciones de leche en la lactancia (no hubo diferencias entre ovejas AOF y BOF que criaban corderas) y, por lo tanto, pudo contribuir a explicar el hecho de que las corderas BOF y AOF no mostraron diferencias ni en peso al destete, ni en la ganancia de peso durante el engorde intensivo, ni en los pesos musculares individuales a la faena. Esto, sin embargo, no ocurrió así para los machos, en los cuales (sobre la base de la teoría Trivers y Willard) podríamos especular que las madres en peor ambiente (BOF) habrían invertido menos en ellos tanto durante la gestación (menores movilizaciones corporales) como durante la lactación (peor producción de leche), desencadenando así los marcados efectos negativos evidenciados en la prole masculina BOF (menos peso al destete, menos ganancia de peso en el engorde y músculos más livianos a la faena; capítulo 4).

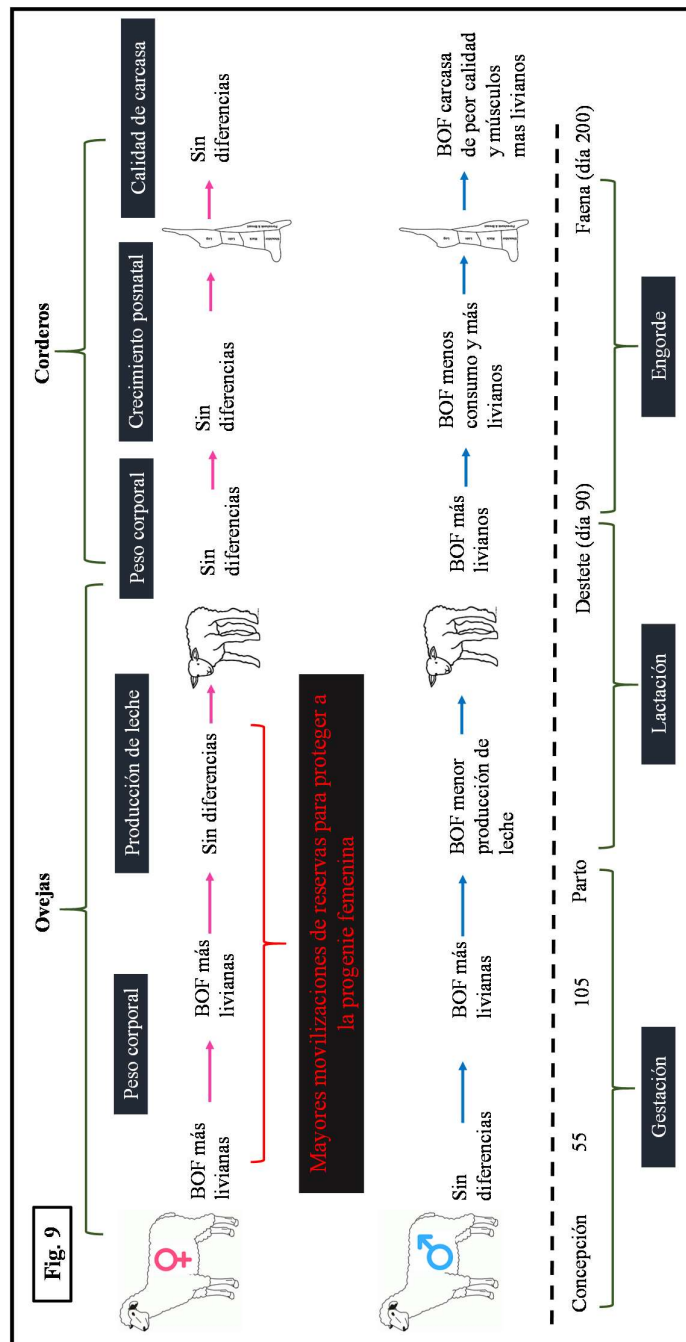


**Figura 9:**

Esquema representativo de los efectos sexo-dependientes del tratamiento nutricional a lo largo del experimento 2. El esquema muestra cómo estos se evidenciaron tanto en las ovejas (pesos corporales durante la gestación y producción de leche durante la lactación) como en los corderos, tanto al destete como durante el engorde y en la faena (calidad de la canal y pesos musculares). El esquema permite

asociar los mayores efectos evidenciados entre los corderos AOF y BOF machos con el hecho de que tanto durante la gestación como durante la lactación las ovejas BOF gestando hembras puedan haber desarrollado una estrategia para proteger a la progenie de los efectos de la subnutrición evidenciables a través de mayores movilizaciones de reservas corporales propias (cambios más prematuros y profundos en los pesos corporales en ovejas BOF gestantes de hembras) y de la ausencia de diferencias en las producciones de leche entre ovejas AOF y BOF criando corderas.

A su vez, es importante resaltar que, como se detalla en los capítulos 4 y 5, los hallazgos de efectos sexo-dependientes de programación fetal involucraron tanto efectos detectados sobre las hembras gestantes como sobre los corderos en distintas etapas de su desarrollo y/o ciclo productivo. Al mismo tiempo, es destacable también que (como se comentó en profundidad en el capítulo 1) el hallazgo de efectos más marcados de programación fetal por subnutrición sobre la habilidad para el desarrollo posnatal en machos que en hembras ha sido reportado en otras especies como roedores de laboratorio (Oyhenart et al., 2003), seres humanos (Gohlke et al., 2009) o cerdos (Gonzalez-Bulnes et al., 2012). Asimismo, como se ejemplifica en la figura 10, es importante destacar que los efectos sexo-dependientes detectados en nuestro trabajo también abarcaron variables muy diversas que van desde pesos corporales hasta variables de calidad de la carne, pasando por variables de desempeño productivo, estimaciones ultrasonográficas de masa muscular, pesos musculares, calidad de carcasa o incluso variables de composición y estructura muscular, tales como diferencias en los tipos de fibras o en el contenido lipídico muscular.

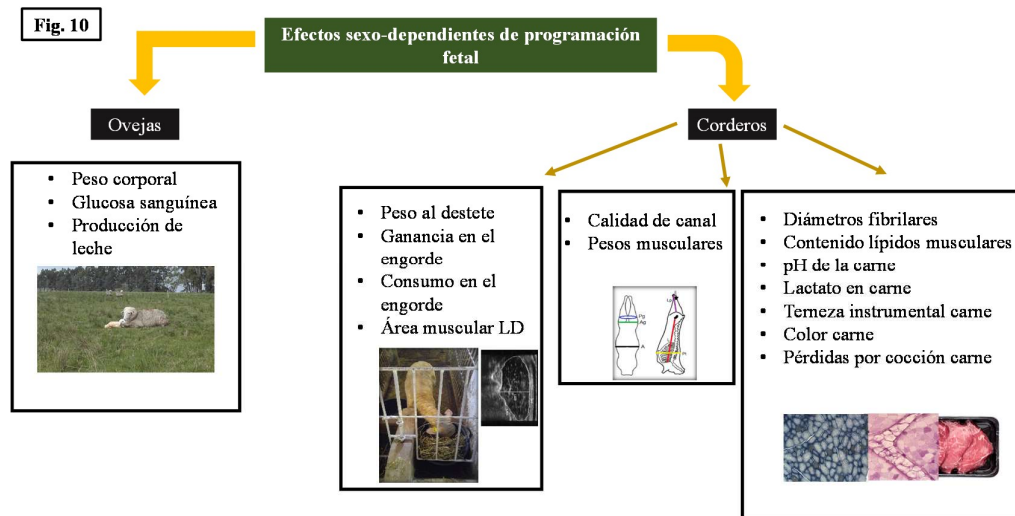


**Figura 10:**

Esquema mostrando variables en las que se detectó efectos sexo-dependientes de programación fetal tanto en las ovejas como en los corderos.

En síntesis, nuestros resultados permiten afirmar que los efectos de programación fetal por subnutrición sobre el desarrollo muscular, el desempeño productivo y la calidad de la carne varían en función del sexo de la progenie. Asimismo, nuestros resultados indican que la progenie masculina podría ser la más afectada por un ambiente nutricional materno restrictivo, sobre todo en términos de crecimiento y eficiencia productiva, y que ello podría estar asociado con el desarrollo de una estrategia de protección de la progenie femenina ante situaciones ambientales restrictivas. Estos resultados son de suma relevancia y destacan la importancia de considerar el sexo de la progenie a la hora de evaluar efectos de programación fetal por subnutrición sobre el desarrollo muscular, el crecimiento y la aptitud carnicera. Esto, además, puede tener una gran incidencia sobre la producción de carne no solo ovina sino también bovina, dada la importancia que poseen los machos en los sistemas de producción de carne, sobre todo para alcanzar la producción de canales más pesadas y magras, así como también la obtención de cortes de mayor calibre.

## **7. CONCLUSIONES**

A continuación se enumeran las conclusiones de la presente tesis.

1. Una menor oferta de forraje de campo natural asignada a ovejas durante la gestación afecta negativamente la miogénesis hiperplásica secundaria a los 70 días de desarrollo fetal.
2. Una menor oferta de forraje de campo natural asignada a ovejas gestantes hasta el día 122 de gestación afecta negativamente las características musculares en corderos neonatos, determinando músculos con marcados signos de peores capacidades hipertróficas posnatales.
3. Una menor oferta de forraje de campo natural asignada a ovejas gestantes afecta la composición fibrilar tanto al nacimiento como a los 200 días de vida, determinando la presencia de músculos, en general, más lentos y oxidativos.
4. Una menor oferta de forraje de campo natural asignada a ovejas gestantes afecta el crecimiento posnatal, el desempeño productivo, la aptitud carnicera y la calidad de la carne en corderos pesados de 200 días, aunque la mayoría de estos efectos operan de forma sexo-dependiente.
5. Los resultados de la presente tesis en su conjunto alertan sobre la posibilidad de que con determinados manejos nutricionales extensivos sobre campo natural aplicados a ovejas gestantes se pueda estar limitando la potencialidad productiva de carne de la progenie y, al mismo tiempo, resaltan la importancia que puede tener la nutrición de las ovejas de cría durante las primeras etapas de la gestación para el futuro productivo y la calidad de carne de sus corderos.
6. A pesar de que los resultados de la presente tesis permiten el planteo de diferentes modelos teóricos para la explicación de los efectos de programación fetal por subnutrición sobre la miogénesis en diferentes momentos del desarrollo ovino, queda por delante el diseño de experimentos controlados que permitan determinar con mayor nivel de precisión qué factor termina incidiendo más sobre los efectos de la programación fetal sobre la

miogénesis: la subnutrición y/o el tipo de subnutrición durante la ventana crítica para la miogénesis secundaria o la imposibilidad para compensar esos efectos durante la miogénesis hipertrófica.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

- Adair LS, Kuzawa CW, Borja J. 2001. Maternal energy stores and diet composition during pregnancy program adolescent blood pressure. *Circulation*, 104(9): 1034-1039.
- Alasnier C, Rémignon H, Gandemer G. 1996. Lipid characteristics associated with oxidative and glycolytic fibres in rabbit muscles. *Meat Science*, 43(3-4): 213-224.
- Allen RE, Boxhorn LK. 1989. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *Journal of Cellular Physiology*, 138(2): 311-315.
- Allen ER, Pepe FA. 1965. Ultrastructure of developing muscle cells in the chick embryo. *American Journal of Anatomy*, 116(1): 115-147.
- Alvarenga TI, Copping KJ, Han X, Clayton EH, Meyer RJ, Rodgers RJ, McMillen IC, Perry VEA, Geesink G. 2016. The influence of peri-conception and first trimester dietary restriction of protein in cattle on meat quality traits of entire male progeny. *Meat Science*, 121: 141-147.
- Ashmore CR, Doerr L. 1971. Comparative aspects of muscle fiber types in different species. *Experimental Neurology*, 31(3): 408-418.
- Barker DJP, Hanson MA. 2004. Altered regional blood flow in the fetus: the origins of cardiovascular disease? *Acta Paediatrica*, 93(12): 1559-1560.
- Barker DJ. 1995. Fetal origins of coronary heart disease. *British Medical Journal*, 311(6998): 171-174.

- Barker DJ. 1998. In utero programming of chronic disease. *Clinical Science*, 95(2): 115-128.
- Bauer R, Walter B, Brust P, Füchtner F, Zwiener U. 2003. Impact of asymmetric intrauterine growth restriction on organ function in newborn piglets. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 110: S40-S49.
- Bauer R, Wank V, Walter B, Blickhan R, Zwiener U. 2000. Reduced muscle vascular resistance in intrauterine growth restricted newborn piglets. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 52(3): 271-276.
- Bauman DE, Eisemann JH, Currie WB. 1982. Hormonal effects on partitioning of nutrients for tissue growth: role of growth hormone and prolactin. *Federation Proceedings*, 41(9): 2538-2544.
- Becker T. 2000. Consumer perception of fresh meat quality: a framework for analysis. *British Food Journal*, 102(3): 158–176.
- Bell AW. 2006. Prenatal programming of postnatal productivity and health of livestock: a brief review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46(7): 725-732.
- 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.º, 1994, Montevideo, Uruguay). *Memorias. Montevideo. S.U.L.* pp. 259-278.
- Bielli A, Pérez R, Pedrana G, Milton JT, Lopez Á, Blackberry MA, Duncombe G, Rodriguez-Martinez H, Martin GB. 2002. Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reproduction, Fertility and Development*, 14(6): 333-337.
- Blaauw B, Reggiani C. 2014. The role of satellite cells in muscle hypertrophy. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 35(1): 3-10.
- Bolster DR, Kubica N, Crozier SJ, Williamson DL, Farrell PA, Kimball SR, Jefferson LS. 2003. Immediate response of mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated signaling following acute resistance exercise in rat skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 553:213–220.

- Bonen A, Tan MH, Watson-Wright WM. 1981. Insulin binding and glucose uptake differences in rodent skeletal muscles. *Diabetes*, 30(8): 702-704.
- Bredahl L. 2004. Cue utilisation and quality perception with regard to branded beef. *Food Quality and Preference*, 15(1): 65-75.
- Briozzo L, Coppola F, Gesuele JP, Tomasso G. 2013. Restricción de crecimiento fetal, epigenética y transmisión transgeneracional de las enfermedades crónicas y la pobreza. *Horizonte Médico*, 13(4): 45-53.
- Brown LD. 2014. Endocrine regulation of fetal skeletal muscle growth: impact on future metabolic health. *The Journal of Endocrinology*, 221(2): R13.
- Brunk CF. 1981. Mitochondrial proliferation during myogenesis. *Experimental Cell Research*, 136(2): 305–309.
- Buckingham M, Relaix F. 2007. The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23: 645-673.
- Bünger L, Navajas EA, Stevenson L, Lambe NR, Maltin CA, Simm G, Fisher AV, Chang KC. 2009. Muscle fibre characteristics of two contrasting sheep breeds: Scottish Blackface and Texel. *Meat Science*, 81(2): 372-381.
- Carrio E, Diez-Villanueva A, Lois S, Mallona I, Cases I, Forn M, Peinado MA, Suelves M. 2015. Deconstruction of DNA methylation patterns during myogenesis reveals specific epigenetic events in the establishment of the skeletal muscle lineage. *Stem Cells*, 33(6):2025-36.
- Cerisuelo A, Baucells MD, Gasa J, Coma J, Carrion D, Chapinal N, Sala R. 2009. Increased sow nutrition during midgestation affects muscle fiber development and meat quality, with no consequences on growth performance. *Journal of Animal Science*, 87(2): 729-739.
- Chang EI, Rozance PJ, Wesolowski SR, Nguyen LM, Shaw SC, Sclafani RA, Bjorkman KK, Peter AK, Hay J, WW, Brown LD. 2020. Rates of myogenesis and myofiber numbers are reduced in late gestation IUGR fetal sheep. *Journal of Endocrinology*, 244(2): 339-352.

- Chang KC, Fernandes K. 1997. Developmental expression and 5' cloning of the porcine 2x and 2b myosin heavy chain genes. *DNA and Cell Biology*, 16(12): 1429-1437.
- Chang KC, Fernandes K, Dauncey MJ. 1995. Molecular characterization of a developmentally regulated porcine skeletal myosin heavy chain gene and its 5' regulatory region. *Journal of Cell Science*, 108(4): 1779-1789.
- Cho M, Hughes SM, Karsch-Mizrachi I, Travis M, Leinwand LA, Blau HM. 1994. Fast myosin heavy chains expressed in secondary mammalian muscle fibers at the time of their inception. *Journal of Cell Science*, 107(9): 2361-2371.
- Christensen M, Erthjerg P, Failla S, Sañudo C, Richardson RI, Nute GR, Olleta JL, Panea B, Albertí P, Juárez M, Hocquette JF, Williams JL. 2011. Relationship between collagen characteristics, lipid content and raw and cooked texture of meat from young bulls of fifteen European breeds. *Meat Science*, 87(1): 61-65.
- Cronjé PB. 2003. Foetal programming of immune competence. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 43(12): 1427-1430.
- Daugaard JR, Richter EA. 2001. Relationship between muscle fibre composition, glucose transporter protein4 and exercise training: possible consequences in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Physiologica Scandinavica*, 171: 267– 276.
- Davegårdh C, Broholm C, Perfilyev A, Henriksen T, García-Calzón S, Peijs L, Hansen NS, Volkov P, Kjøbsted R, Wojtaszewski JFP, Pedersen M, Pedersen BK, Ballak DV, Dinarello CA, Heinhuis B, Joosten LAB, Nilsson E, Vaag A, Scheele C, Ling C. 2017. Abnormal epigenetic changes during differentiation of human skeletal muscle stem cells from obese subjects. *BMC Medicine*, 15(1): 1-27.
- Devlin RB, Emerson CP. 1979. Coordinate accumulation of contractile protein mRNAs during myoblast differentiation. *Developmental Biology*, 69: 202-216.

- Du M, Tong J, Zhao J, Underwood KR, Zhu M, Ford SP, Nathanielsz PW. 2010. Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *Journal of Animal Science*, 88(13): E51-E60.
- Dwyer CM, Stickland NC. 1992. Does the anatomical location of a muscle affect the influence of undernutrition on muscle fibre number? *Journal of Anatomy*, 181(Pt 2), 373.
- England EM, Scheffler TL, Kasten SC, Matarneh SK, Gerrard DE. 2013. Exploring the unknowns involved in the transformation of muscle to meat. *Meat Science*, 95(4): 837-843.
- Erbay E, Park IH, Nuzzi PD, Schoenherr CJ, Chen J. 2003. IGF-II transcription in skeletal myogenesis is controlled by mTOR and nutrients. *Journal of Cell Biology*, 163: 931–936.
- Essén-Gustavsson B, Karlsson A, Lundstrom K, Enfält AC. 1994. Intramuscular fat and muscle fibre lipid contents in halothane-gene-free pigs fed high or low protein diets and its relation to meat quality. *Meat Science* 38, 269–277.
- Fazarinc G, Majdic G, Lorger J, Pogacnik A, Bavdek SV. 1995. Combined histochemical and immunohistochemical determination of three muscles fibre types in a single section of porcine skeletal muscle. *European Journal of Histochemistry*, 39: 309-316.
- Finkelstein DI, Andrianakis P, Luff AR, Walker DW. 1992. Developmental changes in hindlimb muscles and diaphragm of sheep. *American Journal of Physiology*, 263:R900–8.
- Florini JR, Ewton DZ, Magri KA. 1991. Hormones, growth factors, and myogenic differentiation. *Annual Review of Physiology*, 53(1): 201-216.
- Florini JR. 1987. Hormonal control of muscle growth. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, 10(7): 577-598.
- 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(5): 1285-1294.
- Fowden AL, Hill DJ. 2001. Intra-uterine programming of the endocrine pancreas. *British Medical Bulletin*, 60(1): 123-142.
- Fujita M, Roth E, Lo YJ, Hurst C, Vollner J, Kendell A. 2012. In poor families, mothers' milk is richer for daughters than sons: A test of Trivers–Willard hypothesis in agropastoral settlements in Northern Kenya. *American Journal of Physical Anthropology*, 149(1): 52-59.
- Gaben AM, Saucier C, Bedin M, Barbu V, Mester J. 2004. Rapamycin inhibits cdk4 activation, p 21(WAF1/CIP1) expression and G1-phase progression in transformed mouse fibroblasts. *International Journal of Cancer*, 108: 200–206.
- Gagnière H, Picard B, Geay Y. 1999. Contractile differentiation of fetal cattle muscles: intermuscular variability. *Reproduction Nutrition Development*, 39(5-6): 637-655.
- Gardner JM, Ineck NE, Quarnberg SM, Legako JF, Carpenter CE, Rood KA, Thornton KJ. 2021. The Influence of Maternal Dietary Intake During Mid-Gestation on Growth, Feedlot Performance, miRNA and mRNA Expression, and Carcass and Meat Quality of Resultant Offspring. *Meat and Muscle Biology*, 5(1).
- Gaster M, Staehr P, Beck-Nielsen H, Schroder HD, Handberg A. 2001. GLUT4 is reduced in slow muscle fibers of type 2 diabetic patients: is insulin resistance in type 2 diabetes a slow, type 1 fiber disease? *Diabetes* 50, 1324– 1329.
- Gauvin MC, Pillai SM, Reed SA, Stevens JR, Hoffman ML, Jones AK, Zinn SA, Govoni KE. 2020. Poor maternal nutrition during gestation in sheep alters prenatal muscle growth and development in offspring. *Journal of Animal Science*, 98(1): skz388.
- Gohlke BC, Stutte S, Bartmann P, Woelfle J. 2009. Does gender-specific BMI development modulate insulin sensitivity in extremely low birth weight

- infants? *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 22(9): 827-836.
- Göthe S, Wang Z, Ng L, Kindblom JM, Barros AC, Ohlsson C, Vennström B, Forrest D. 1999. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary–thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes and Development*, 13(10): 1329-1341.
- Graziotti G, Ríos C, Basso L. 2000. Las fibras musculares esqueléticas y la producción de carne en el cerdo. *Revista Argentina de Producción Animal* 20(2): 145-159.
- Hales CN, Barker DJ. 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, 35(7): 595-601.
- Hausman GJ, Watson R. 1994. Regulation of fetal muscle development by thyroxine. *Acta Anatomica Basel*, 149:21–30.
- Hausman GJ. 1989. Histochemical studies of muscle development in decapitated and hypophysectomized pig fetuses: blood vessel development. *Journal of Animal Science*, 67:1367–74.
- He J, Watkins S, Kelley DE. 2001. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes*, 50(4): 817-823.
- Henckel P, Oksbjerg N, Erlandsen E, Barton-Gade P, Bejerholm C. 1997. Histo and biochemical characteristics of the longissimus dorsi muscle in pigs and their relationships to performance and meat quality. *Meat Science* 47: 311-321.
- Hertzman C, Olsson U, Tornberg E. 1993. The influence of high-temperature, type of muscle and electrical-stimulation on the course of rigor, aging and tenderness of beef muscles. *Meat Science*, 35: 119-141.
- Hodgson J. 1985. The control of herbage intake in the grazing ruminant. *Proceedings of the Nutrition Society*, 44(2): 339-346.
- Huff-Lonergan E, Zhang W, Lonergan SM. 2010. Biochemistry of postmortem muscle — Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science*, 86: 184–195.

- Huff-Lonergan E, Lonergan SM. 1999. Postmortem mechanisms of meat tenderization. The roles of the structural proteins and the calpain system. En: Xiong et al. (Eds). Quality attributes of muscle foods. Kluwer Academic/ Plenum Publishers. New York. Pp. 229-251.
- Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA. 1993. Selective accumulation of myoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscles is controlled by innervation and hormones. *Development*, 118: 1137-1147.
- Hurley MS, Flux C, Salter AM, Brameld JM. 2006. Effects of fatty acids on skeletal muscle cell differentiation in vitro. *British Journal of Nutrition*, 95(3): 623-630.
- Ithurralde J, Bianchi G, Feed O, Nan F, Ballesteros F, Garibotto G, Bielli A. 2020. The effects of hot boning on meat quality from six different contractile-metabolic sheep muscles: A preliminary study. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(10): e14778.
- Jennings TD, Gonda MG, Underwood KR, Wertz-Lutz AE, Blair AD. 2016. The influence of maternal nutrition on expression of genes responsible for adipogenesis and myogenesis in the bovine fetus. *Animal*, 10(10): 1697-1705.
- Jurie C, Robelin J, Picard B, Geay Y. 1995. Post-natal changes in the biological characteristics of semitendinosus muscle in male Limousin cattle. *Meat Science*, 41(2): 125-135.
- Kalbe C, Bérard J, Porm M, Rehfeldt C, Bee G. 2013. Maternal L-arginine supplementation during early gestation affects foetal skeletal myogenesis in pigs. *Livestock Science*, 157(1): 322-329.
- Keller JM, Nameroff M. 1974. Induction of creatine phosphokinase in cultures of chick skeletal myoblasts without concomitant cell fusion. *Differentiation*, 2(1): 19-23.
- Kelly RW, Greeff JC, Macleod I. 2006. Lifetime changes in wool production of Merino sheep following differential feeding in fetal and early life. *Australian Journal of Agricultural Research*, 57: 867-876.

- Kenyon PR, Blair HT. 2014. Foetal programming in sheep—effects on production. *Small Ruminant Research*, 118(1-3): 16-30.
- Kitzmann M, Fernandez A. 2001. Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(4): 571-579.
- Klingmann PO, Kugler I, Steffke TS, Bellingrath S, Kudielka BM, Hellhammer DH. 2008. Sexspecific Prenatal Programming: A Risk for Fibromyalgia? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1148(1): 446-455.
- Klont RE, Brocks L, Eikelenboom G. 1998. Muscle fibre type and meat quality. *Meat Science*, 49: S219-S229.
- Knudsen KA, Horwitz AF. 1977. Tandem events in myoblast fusion. *Developmental Biology*, 58(2): 328–338.
- Lan X, Cretney EC, Kropp J, Khateeb K, Berg MA, Peñagaricano F, Magness R, Radunz AE, Khatib H. 2013. Maternal diet during pregnancy induces gene expression and DNA methylation changes in fetal tissues in sheep. *Frontiers in Genetics*, 4:49. doi: 10.3389/fgene.2013.00049.
- Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA. 2007. PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochemical Pharmacology*, 73(1): 1-14.
- Lawrie RA, Ledward DA. 2006. *Lawrie's meat science*. Woodhead Publishing. Cambridge, U.K.
- Lee SH, Joo ST, Ryu YC. 2010. Skeletal muscle fiber type and myofibrillar proteins in relation to meat quality. *Meat Science*, 86: 166–170.
- Lefaucheur L, Edom F, Ecolan P, Butler-Browne GS. 1995. Pattern of muscle fiber type formation in the pig. *Developmental Dynamics*, 203: 27-41.
- Lefaucheur L, le Peuch C, Barenton B, Vigneron P. 1986. Characterization of insulin binding to slices of slow and fast twitch skeletal muscles in the rabbit. *Hormone and Metabolic Research*, 18: 725-729.
- LeRoith D. 2000. Insulin-like growth factor I receptor signaling—overlapping or redundant pathways? *Endocrinology*, 141(4): 1287-1288.

- Leseigneur-Meynier A, Gandemer G. 1991. Lipid composition of pork muscle in relation to the metabolic type of the fibres. *Meat Science*, 29: 229–241.
- Lie S, Morrison JL, Williams-Wyss O, Suter CM, Humphreys DT, Ozanne SE, Zhang S, MacLaughlin SM, Kleemann DO, Walker SK, Roberts CT, McMillen IC. 2015. Impact of periconceptional and preimplantation undernutrition on factors regulating myogenesis and protein synthesis in muscle of singleton and twin fetal sheep. *Physiological Reports*, 3(8): e12495.
- Limesand SW, Jensen J, Hutton JC, Hay Jr WW. 2005. Diminished  $\beta$ -cell replication contributes to reduced  $\beta$ -cell mass in fetal sheep with intrauterine growth restriction. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(5): R1297-R1305.
- Lipton BH, Konigsberg IR. 1972. A fine-structural analysis of the fusion of myogenic cells. *Journal of Cell Biology*, 53: 348-364.
- Maccatrozzo L, Patruno M, Toniolo L, Reggiani C, Mascarello F. 2004. Myosin Heavy Chain 2B isoform is expressed in specialized eye muscles but not in trunk and limb muscles of cattle. *European Journal of Histochemistry*, 48(4):357-366.
- Malenfant P, Joannis DR, Theriault R, Goodpaster BH, Kelley DE, Simoneau JA. 2001. Fat content in individual muscle fibers of lean and obese subjects. *International Journal of Obesity*, 25: 1316–1321.
- Malttn CA, Warkup CC, Matthews KR, Grant CM, Porter AD, Delday MI. 1997. Pig muscle characteristics as a source of variation in eating quality. *Meat Science*, 47(3-4):237-248.
- Mavalli MD, DiGirolamo DJ, Fan Y, Riddle RC, Campbell KS, Van Groen T, Frank SJ, Sperling MA, Esser KA, Bamman MM, Clemens TL. 2010. Distinct growth hormone receptor signaling modes regulate skeletal muscle development and insulin sensitivity in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11): 4007-4020.

- Maxfield EK, Sinclair KD, Dolman DF, Staines ME, Maltin CA. 1997. In vitro culture of sheep embryos increases weight, primary fiber size and secondary to primary fiber ratio in fetal muscle at day 61 of gestation. *Theriogenology*, 1(47): 376.
- McLennan IS. 1994. Neurogenic and myogenic regulation of skeletal muscle formation: a critical re-evaluation. *Progress in Neurobiology*, 44(2): 119-140.
- McNamara LB, Giblin L, Markham T, Stickland NC, Berry DP, O'Reilly JJ, ..., Lawlor PG. 2011. Nutritional intervention during gestation alters growth, body composition and gene expression patterns in skeletal muscle of pig offspring. *Animal*, 5(8): 1195-1206.
- Megeney LA, Neufer PD, Dohm GL, Tan MH, Blewett CA, Elder GC, Bonen A. 1993. Effects of muscle activity and fiber composition on glucose transport and GLUT-4. *American Journal of Physiology*, 264(E): 583-593.
- Meyer AM, Reed JJ, Vonnahme KA, Soto-Navarro SA, Reynolds LP, Ford SP, Hess BW, Caton JS. 2010. Effects of stage of gestation and nutrient restriction during early to mid-gestation on maternal and fetal visceral organ mass and indices of jejunal growth and vascularity in beef cows. *Journal of Animal Science*, 88(7): 2410-2424.
- Monin G. 1988. Evolution post-mortem du tissu musculaire et conséquences sur les qualités de la viande de porc. *Journées de la Recherche Porcine en France*, 20: 201-214.
- Montarras D, L'honoré A, Buckingham M. 2013. Lying low but ready for action: the quiescent muscle satellite cell. *The FEBS Journal*, 280(17): 4036-4050.
- Morris ST. 2017. Overview of sheep production systems. En: *Advances in sheep welfare* (pp. 19-35). Woodhead Publishing.
- Nagata Y, Kobayashi H, Umeda M, Ohta N, Kawashima S, Zammit PS, Matsuda R. 2006. Sphingomyelin levels in the plasma membrane correlate with the

- activation state of muscle satellite cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54(4): 375-384.
- Nathanielsz PW, Hanson MA. 2003. The fetal dilemma: spare the brain and spoil the liver. *The Journal of Physiology*, 548(Pt 2): 333.
- Nissen PM, Danielsen VO, Jorgensen PF, Oksbjerg N. 2003. Increased maternal nutrition of sows has no beneficial effects on muscle fiber number or postnatal growth and has no impact on the meat quality of the offspring. *Journal of Animal Science*, 81(12): 3018-3027.
- Noya A, Ripoll G, Casasús I, Sanz A. 2022. Long-term effects of early maternal undernutrition on the growth, physiological profiles, carcass and meat quality of male beef offspring. *Research in Veterinary Science*, 142, 1-11.
- Nute GR. 2002. Sensory analysis of meat. En: J. Kerry, J. Kerry & D. Ledward, *Meat Processing: Improving Quality* (pp. 175-190). Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
- Nyholm B, Qu Z, Kaal A, Pedersen SB, Gravholt CH, Andersen JL, Saltin B, Schmitz O. 1997. Evidence of an increased number of type IIb muscle fibers in insulin-resistant first-degree relatives of patients with NIDDM. *Diabetes* 46: 1822– 1828.
- Oksbjerg N, Nissen PM, Therkildsen M, Møller HS, Larsen LB, Andersen M, Young JF. 2013. Meat science and muscle biology symposium: in utero nutrition related to fetal development, postnatal performance, and meat quality of pork. *Journal of Animal Science*, 91(3): 1443-1453.
- Ono Y, Boldrin L, Knopp P, Morgan JE, Zammit PS. 2010. Muscle satellite cells are a functionally heterogeneous population in both somite-derived and branchiomic muscles. *Developmental Biology*, 337(1): 29-41.
- Ontell M, Bourke D, Hughes D. 1988. Cytoarchitecture of the fetal murine soleus muscle. *American Journal of Anatomy*, 181(3): 267-278.
- Ouali A, Herrera-Mendez CH, Coulis G, Becila S, Boudjellal A, Aubry L, Sentandreu MA. 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 74(1): 44-58.

- Ouali A, Talmant A. 1990. Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Science*, 28(4): 331-348.
- Oyhenart EE, Orden B, Fucini MC, Muñe MC, Pucciarelli HM. 2003. Sexual dimorphism and postnatal growth of intrauterine growth retarded rats. *Growth Development and Aging*, 67(2): 73-84.
- Ozanne SE, Wang CL, Coleman N, Smith GD. 1996. Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 271(6): E1128-E1134.
- Piaggio L. 2014. Suplementación de la recría y engorde de ovinos sobre campo natural. pp. 45 En: Seminario de Actualización Técnica: Producción de Carne Ovina de Calidad. INIA Serie técnica 221. ISSN: 1688-9266.
- Picard B, Gagnière H, Geay Y. 1996. Contractile differentiation of bovine masseter muscle. *Basic and Applied Myology*, 6(5): 361-372.
- Picard B, Gagaoua M. 2020. Muscle fiber properties in cattle and their relationships with meat qualities: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(22): 6021-6039.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411): 143-147.
- Poso AR, Puolanne E. 2005. Carbohydrate metabolism in meat animals. *Meat Science*, 70: 423–434.
- Purslow PP, Warner RD, Clarke FM, Hughes JM. 2020. Variations in meat colour due to factors other than myoglobin chemistry; a synthesis of recent findings (invited review). *Meat Science*, 159: 107941.
- Ramírez M, Testa LM, Valiente SL, Latorre ME, Long NM, Rodriguez AM, Pavan E, Maresca S. 2020. Maternal energy status during late gestation: Effects on growth performance, carcass characteristics and meat quality of steers progeny. *Meat Science*, 164: 108095.

- Rehfeldt C, Stabenow B, Pfuhl R, Block J, Nürnberg G, Otten W, Metges CC, Kalbe C. 2012. Effects of limited and excess protein intakes of pregnant gilts on carcass quality and cellular properties of skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue in fattening pigs. *Journal of Animal Science*, 90(1): 184-196.
- Rehfeldt C, Tuchscherer A, Hartung M, Kuhn G. 2008. A second look at the influence of birth weight on carcass and meat quality in pigs. *Meat Science*, 78(3): 170-175.
- Ross JJ, Duxson MJ, Harris AJ. 1987. Formation of primary and secondary myotubes in rat lumbrical muscles. *Development*, 100(3): 383-394.
- Ruusunen M, Puolanne E. 1997. Comparison of histochemical properties of different pig breeds. *Meat Science*, 45: 119-125.
- Sazili AQ, Parr T, Sensky PL, Jones SW, Bardsley RG, Buttery PJ. 2005. The relationship between slow and fast myosin heavy chain content, calpastatin and meat tenderness in different ovine skeletal muscles. *Meat Science*, 69: 17-25.
- Schiaffino S, Reggiani C. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*, 91(4): 1447-1531.
- Schiaffino S, Reggiani C. 1996. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiological Reviews*, 76: 371-23.
- Schultz E. 1996. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Developmental Biology*, 175(1): 84-94.
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102(6): 777-786.
- Shackelford SD, Koohmaraie M, Cundiff LV, Gregory KE, Rohrer GA, Savell JW. 1994. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. *Journal of Animal Science*, 72(4): 857-863.

- Sibbald AM, Davidson GC. 1998. The effect of nutrition during early life on voluntary food intake by lambs between weaning and 2 years of age. *Animal Science*, 66(3): 697-703.
- Singh K, Dobbie PM, Simmons NJ, Duganzich D, Bass JJ. 1997. The effects of the calpain proteolytic system on meat tenderisation rates in different ovine skeletal muscles. En: *Proceedings of the 43<sup>rd</sup> international congress of meat science and technology* (pp. 612–613), New Zealand.
- Soder KJ, Gregorini P, Scaglia G, Rook, AJ. 2009. Dietary selection by domestic grazing ruminants in temperate pastures: current state of knowledge, methodologies, and future direction. *Rangeland Ecology & Management*, 62(5): 389-398.
- Soussi-Yanicostas N. 1991. L'ontogenèse musculaire: de l'induction mésodermique à la formation du sarcomère. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 89(4): 255-295.
- Stevenson K, Lillycrop KA, Silver MJ. 2020. Fetal programming and epigenetics. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 13: 1-6.
- Stickland NC, Handel SE. 1986. The numbers and types of muscle fibres in large and small breeds of pigs. *Journal of Anatomy*, 147: 181.
- Stobbs TH. 1973. The effect of plant structure on the intake of tropical pastures. I. Variation in the bite size of grazing cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 24(6): 809-819.
- Swatland HJ. 1984. Muscle fiber differentiation and neuromuscular relationships. En: Swatland HJ. (ed.) *Structure and Development of Meat Animals*, pp. 201-254. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ.
- Tchirikov M, Kertschanska S, Schröder HJ. 2003. Differential effects of catecholamines on vascular rings from ductus venosus and intrahepatic veins of fetal sheep. *The Journal of Physiology*, 548(2): 519-526.
- Thomsen HH, Zeuthen P. 1988. The influence of mechanically deboned meat and pH on the water-holding capacity and texture of emulsion type products. *Meat Science*, 24: 189-201.

- Tomat AL, Salazar FJ. 2014. Mechanisms involved in developmental programming of hypertension and renal diseases. Gender differences. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 18(2): 63-77.
- Tzahor E, Kempf H, Mootoosamy RC, Poon AC, Abzhanov A, Tabin CJ, Dietrich S, Lassar AB. 2003. Antagonists of Wnt and BMP signaling promote the formation of vertebrate head muscle. *Genes and Development*, 17(24): 3087-3099.
- Vandenburgh HH, Karlisch P, Shansky J, Feldstein R. 1991. Insulin and IGF-I induce pronounced hypertrophy of skeletal myofibers in tissue culture. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 260(3): C475-C484.
- Velloso CP. 2008. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *British Journal of Pharmacology*, 154: 557–568.
- Wang J, Li X, Yang X, Sun Q, Huang R, Xing J, Zhao R. 2011. Maternal dietary protein induces opposite myofiber type transition in Meishan pigs at weaning and finishing stages. *Meat Science*, 89(2): 221-227.
- Wank V, Bauer R, Walter B, Kluge H, Fischer MS, Blickhan R, Zwiener U. 2000. Accelerated contractile function and improved fatigue resistance of calf muscles in newborn piglets with IUGR. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278(2): R304-R310.
- Weiler U, Appell HJ, Kremser M, Hofäcker S, Claus, R. 1995. Consequences of selection on muscle composition. A comparative study on gracilis muscle in wild and domestic pigs. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 24(2): 77-80.
- Weinberg J. 1988. Hyperresponsiveness to stress: Differential effects of prenatal ethanol on males and females. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 12(5): 647-652.
- White RB, Biérinx AS, Gnocchi VF, Zammit PS. 2010. Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC Developmental Biology*, 10(1): 1-11.

- Wigmore PM, Dunglison GF. 2002. The generation of fiber diversity during myogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 42(2): 117-125.
- Wood JD, Enser M, Fisher AV, Nute GR, Sheard PR, Richardson RI, Hughes SI, Whittington FM. 2008. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78(4): 343-358.
- 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(9): 2316-2337.
- Yin H, Price F, Rudnicki MA. 2013. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiological Reviews*, 93(1): 23-67.
- Yu F, Göthe S, Wikström L, Forrest D, Vennström B, Larsson L. 2000. Effects of thyroid hormone receptor gene disruption on myosin isoform expression in mouse skeletal muscles. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278(6): R1545-R1554.
- Zammit PS, Carvajal JJ, Golding JP, Morgan JE, Summerbell D, Zolnerchiks J, Partridge TA, Rigby PWJ, Beauchamp JR. 2004. Myf5 expression in satellite cells and spindles in adult muscle is controlled by separate genetic elements. *Developmental Biology*, 273(2): 454-465.
- Zammit PS, Heslop L, Hudon V, Rosenblatt JD, Tajbakhsh S, Buckingham ME, Beauchamp JR, Partridge TA. 2002. Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. *Experimental Cell Research*, 281(1): 39-49.
- Zhou X, Yan Q, Liu L, Chen G, Tang S, He Z, Tan Z. 2021. Maternal undernutrition alters the skeletal muscle development and methylation of myogenic factors in progeny: A randomized controlled trial. [En línea], disponible en: (<https://assets.researchsquare.com/files/rs-169185/v1/d20582a2-2bd8-4c61-b5f5-cf54e4f6ee33.pdf?c=1631872942>)  
último acceso 1 de mayo de 2022.