



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Efectos de la subnutrición de ovejas durante la gestación sobre las respuestas adaptativas de la progenie adulta frente a dos desafíos ambientales

María Florencia CORRALES HLINKA

Magíster en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Animales

Agosto 2023

**Efectos de la subnutrición de ovejas
durante la gestación sobre las respuestas
adaptativas de la progenie adulta frente a
dos desafíos ambientales**

María Florencia CORRALES HLINKA

Magíster en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Animales

Agosto 2023

Tesis aprobada por el tribunal integrado por el Dr. (PhD) Alejandro Bielli, la Dra. (PhD) Lorena Lacuesta y el Dr. (PhD) Fabio Henrique el 19 de setiembre de 2023.
Autora: Dra. María Florencia Corrales Hlinka. Directora: Dra. (PhD) Raquel PérezClariget. Codirectores: Lic. (PhD) Rodolfo Ungerfeld y Dra. (PhD) Aline Freitas de Melo.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es el producto de mucho tiempo de trabajo, dedicación y esfuerzo, pero, sobre todo, es producto de resiliencia, una lucha personal y el constante apoyo de mis seres queridos: familia, amigos y compañeros de trabajo. Por ello, me gustaría comenzar agradeciendo a mi tutora, Raquel Pérez Clariget, por su apoyo constante, el tiempo dedicado y el enorme cariño brindado; gracias por nunca soltarme la mano, incluso en los momentos más difíciles. También me gustaría agradecer a Rodolfo Ungerfeld y Aline Freitas de Melo, en sus roles de coasesores, por sus enseñanzas y aportes constantes en mi proceso de formación y por la paciencia infinita que supieron tenerme. La contención y el apoyo constante de mis asesores en los momentos más difíciles de mi vida fueron lo que me permitió sacar adelante esta tesis, así que van todos mis agradecimientos y reconocimiento para ellos.

En segundo lugar, me gustaría agradecer a mi madre, Cristina: sin su esfuerzo y amor no habría podido llegar tan lejos, y a mis bebés de cuatro patas: Camilita y Wendy. Por ahí hay un viejo dicho que dice «somos pocos, pero buenos», y así es nuestra familia, chiquita pero amada.

También me gustaría agradecer a mis amigas, fueron como estrellas que iluminaron mi cielo en los años donde solo veía oscuridad. Gracias, Cami, por preocuparte, hacerme reír, enojarte y por ser como sos, simplemente Cami. Gracias, Bell, por todo el camino que recorrimos juntas, por las largas horas de charlas, a veces profundas, a veces no tanto, y por estar siempre presente a pesar de tener tus propias batallas. Gracias, Vicky, por haber llegado a mi vida hace 25 años, gracias por ser mi hermana, gracias por quererme, gracias por todo.

Me gustaría agradecer a la institución que me formó como profesional universitaria y continúa formándome siempre con los brazos a abiertos: Facultad de Veterinaria (Udelar). Mis agradecimientos también para Facultad de Agronomía y la Comisión Académica de Posgrado (CAP) por su apoyo para que pueda realizar la maestría. A la estación experimental Bernardo Rosengurtt (EEBR), por permitirme usar sus instalaciones y los animales.

Me gustaría agradecer a todas las personas que me acompañaron a lo largo de este proceso. A Javier Ithurralde, por ser el mejor compañero de oficina que podía tener, por aguantarme la cabeza, por sus palabras amables y por darme siempre para adelante. A Nacho y Nico porque sin su trabajo y esfuerzo constante en el sector ovino de la EEBR, sería imposible llevar a cabo con tanta eficiencia los proyectos de investigación. A Patricia y Livia, por enseñarme a usar las herramientas del laboratorio de Fisiología y a cómo procesar mis muestras. Al equipo médico y sistema de salud en general porque son los que me permitieron estar hoy acá, y, especialmente, a Luján que me escuchó y me ayudó a curar mi interior lastimado.

Finalmente, gracias a todos mis seres queridos por enseñarme que, al final, lo que verdaderamente importa es ser buena persona. Nada es eterno, el que está arriba también cae y lo material se desvanece, pero lo que perdura son nuestras obras y las emociones que dejamos en las personas.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN.....	IX
SUMMARY	X
1- <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. PROGRAMACIÓN FETAL.....	2
1.2. SISTEMA PRODUCTIVO OVINO EN URUGUAY Y PROGRAMACIÓN FETAL.....	4
1.3. PROGRAMACIÓN FETAL Y SUS EFECTOS SOBRE LA FISIOLOGÍA, EL COMPORTAMIENTO Y EL METABOLISMO OVINO.....	5
1.4. PROGRAMACIÓN FETAL Y SU EFECTO EN EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL OVINO	6
1.5. ESTRÉS	7
1.5.1. <u>Respuesta al estrés agudo</u>	8
1.5.2. <u>Respuesta al estrés crónico</u>	11
1.6. TERMORREGULACIÓN EN ANIMALES HOMEOTERMOS	12
1.6.1. <u>Intercambio de calor entre el cuerpo y el medioambiente</u>	14
1.6.2. <u>Temperatura corporal (núcleo y periferia)</u>	16
1.7. AISLAMIENTO SOCIAL COMO UN DESAFÍO PARA EVALUAR LAS CONSECUENCIAS DE LA ALTERACIÓN DE LA PROGRAMACIÓN FETAL EN OVEJAS ADULTAS.....	17
1.8. LA ESQUILA COMO UN DESAFÍO PARA EVALUAR LAS CONSECUENCIAS DE LA PROGRAMACIÓN FETAL EN OVEJAS ADULTAS	19
1.9. ANTECEDENTES NACIONALES DE INVESTIGACIÓN SOBRE PROGRAMACIÓN FETAL EN OVINOS.....	21
2. <u>HIPÓTESIS GENERAL</u>	23
3. <u>OBJETIVO GENERAL</u>	24
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4. <u>ESTRUCTURA DE LA TESIS</u>	25

5. <u>THERMOREGULATORY, METABOLIC AND STRESS RESPONSES TO SPRING SHEARING OF AGED EWES BORN TO UNDERNOURISHED MOTHERS</u>	26
5.1. RESUMEN.....	26
5.2. ABSTRACT	28
5.3. INTRODUCTION	29
5.4. MATERIALS AND METHODS	31
5.4.1. <u>Location</u>	31
5.4.2. <u>Nutritional treatments applied to the mothers during gestation</u>	31
5.4.3. <u>Animals, shearing procedure, and management</u>	32
5.4.4. <u>Ambient recordings</u>	33
5.4.5. <u>Body weight and body condition</u>	33
5.4.6. <u>Behavioural recordings</u>	34
5.4.7. <u>Body surface temperature</u>	34
5.4.8. <u>Blood samples, and metabolites and hormonal determinations</u>	35
5.4.9. <u>Statistical analyses</u>	36
5.5. RESULTS	38
5.5.1. <u>Body weight and body condition</u>	38
5.5.2. <u>Behaviours</u>	38
5.5.3. <u>Body surface temperatures and rectal temperature</u>	42
5.5.4. <u>Metabolites and hormonal determinations</u>	47
5.6. DISCUSSION	50
5.7. REFERENCES	54
6. <u>STRESS RESPONSE TO SOCIAL ISOLATION FOLLOWED BY EXPOSURE TO A NOVEL OBJECT OF AGED EWES BORN TO UNDERNOURISHED MOTHERS</u>	62
6.1. RESUMEN.....	62
6.2. ABSTRACT	64
6.3. INTRODUCTION	65
6.4. MATERIALS AND METHODS	67
6.4.1. <u>Location</u>	67

6.4.2.	<u>Nutritional treatments applied to the ewe's mothers</u>	67
6.4.3.	<u>Experimental animals</u>	68
6.4.4.	<u>Social isolation and novel object test</u>	68
6.4.5.	<u>Physiological recordings: Heart rate, respiratory rate and rectal temperature</u>	69
6.4.6.	<u>Surface temperature</u>	70
6.4.7.	<u>Blood samples, metabolites and hormonal determinations</u>	70
6.4.8.	<u>Behaviour recordings</u>	71
6.4.9.	<u>Statistical analyses</u>	71
6.5.	RESULTS	73
6.5.1.	<u>Behaviours</u>	73
6.5.2.	<u>Heart rate, respiratory rate and rectal temperature</u>	75
6.5.3.	<u>Surface temperature</u>	76
6.5.4.	<u>Blood samples, metabolites and hormonal determinations</u>	78
6.6.	DISCUSSION	79
6.7.	CONCLUSION	81
6.8.	REFERENCES	83
7.	<u>DISCUSIÓN GENERAL</u>	88
8.	<u>CONCLUSIÓN GENERAL</u>	95
9.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	96

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue determinar si la restricción nutricional durante la gestación en ovejas compromete las respuestas fisiológicas y comportamentales de la descendencia adulta frente a desafíos ambientales. Se utilizaron 20 ovejas Corriedale, vacías, nacidas de partos simples de madres que pastorearon campo natural desde 23 días antes de la concepción hasta 122 de la gestación a: 1) alta oferta de forraje (grupo AOF; 10-12 kg de materia seca (MS)/100 kg de peso vivo (PV)/día; n=11] o 2) baja oferta de forraje (grupo BOF; 5-8 kg MS/100 kg PV/día; n=9). Cuando las ovejas hijas tenían 6 años de edad, fueron esquiladas y asignadas al azar a dos parcelas de campo natural. Se registraron el comportamiento, las temperaturas superficiales del ojo, oreja, hocico y vulva, y las concentraciones plasmáticas de albúmina, proteínas totales, glucosa e insulina. Antes de la esquila, las ovejas BOF tuvieron temperaturas superficiales máximas y mínimas en la oreja y el hocico inferiores a las de AOF ($P < 0,05$), mientras que, después de la esquila, la temperatura promedio de la vulva fue más baja en las ovejas BOF que en las AOF ($P < 0,05$), la frecuencia rumiando fue mayor en las ovejas AOF ($P = 0,01$), pero las BOF estuvieron más tiempo paradas que las AOF ($P < 0,0001$). La concentración de insulina tendió a ser mayor en el grupo BOF ($P = 0,06$). Posteriormente, se sometió a todas las ovejas a un test de aislamiento social/objeto novedoso. Se evaluaron el comportamiento, las mismas temperaturas superficiales y metabolitos, las frecuencias cardíaca y respiratoria, la temperatura rectal y el cortisol. Las ovejas AOF tuvieron mayores concentraciones de albúmina que las BOF ($P = 0,02$). En conclusión, la restricción alimenticia intrauterina determinó cambios termorregulatorios, comportamentales y metabólicos a largo plazo en las crías hembras adultas.

Palabras clave: oveja, programación fetal, subnutrición, estrés, esquila

SUMMARY

Undernutrition effects on ewes during gestation on adaptative responses of adult offspring when presented with environmental challenges.

The aim of this work was to determine if nutritional restriction during gestation in ewes compromises the physiological, behavioral and thermoregulatory responses of adult offspring exposed to different environmental challenges. Twenty non-gestating six-year-old Corriedale ewes born to mothers who grazed two pasture allowances from 23 days before conception until 122 days of gestation were used. The pasture allowance offered to the mothers was high [HPA group; n=11; 10-12 kg of dry matter (DM)/100 kg of body weight (BW)/day] or low [LPA group: n=9; 5-8 kg of DM/100 kg of BW/day]. When the daughter ewes were 6 years old, ewes were sheared and randomly assigned to two natural field paddocks. Before and after shearing, behavior, surface temperatures of the eye, ear, nose and vulva, and plasma concentrations of albumin, total protein, glucose and insulin were recorded. Before shearing, LPA ewes had lower maximum and minimum surface temperatures on the ear and nose than HPA ($P < 0.05$). On the other hand, after shearing, the mean vulvar surface temperature was lower in LPA ewes than in HPA ewes ($P < 0.05$), and the proportion of time ruminating was greater in HPA ewes ($P = 0.01$), while LPA ewes stood longer than HPA ewes ($P < 0.0001$). Insulin concentration tended to be higher in the LPA group than in the AOF group ($P = 0.06$). Later, all ewes were evaluated in a social isolation/novel object test. Behaviors, the same surface temperatures and metabolites, heart and respiratory rates, rectal temperature and cortisol were evaluated. HPA ewes had higher albumin concentrations than LPA ($P = 0.02$). These results reinforce the concept that a nutritional restriction during pregnancy determines long-term thermoregulatory, behavioral and metabolic changes in the offspring.

Keywords: sheep, fetal programming, undernourishment, stress, shearing

1- INTRODUCCIÓN

El concepto de programación fetal plantea que las condiciones intrauterinas experimentadas por el feto pueden tener repercusiones en el individuo adulto (Godfrey y Barker, 2001). La nutrición materna es uno de los factores más estudiados y relevantes que alteran la programación fetal. En animales productivos, la subnutrición intrauterina impacta en el comportamiento, la fisiología, el metabolismo y los resultados productivos de la descendencia en diferentes etapas de su vida (Sartori et al., 2020).

En Uruguay, al igual que en la región, la cría ovina se desarrolla sistemas pastoriles a cielo abierto todo el año. La base forrajera fundamental es el campo natural (Campos) que presenta fluctuaciones estacionales en su tasa de crecimiento, con la mínima registrada en invierno (Berretta et al., 1994). Considerando que la época de servicios más frecuente es el otoño, la gestación transcurre en el período en que la disponibilidad de pasturas es menor, por lo que se pueden producir períodos variables de subnutrición durante la gestación. La ingesta de nutrientes de la oveja gestante en estas condiciones no alcanza a cubrir el aumento de los requerimientos de la demanda fetal, por lo que se produce una movilización de las reservas energéticas con la consecuente pérdida de peso y condición corporal. Este escenario interfiere con el normal desarrollo del feto y restringe su potencial productivo y su bienestar a futuro (Kenyon y Blair, 2014). Si bien la subnutrición materna afecta tanto a las crías machos como a las hembras, son estas últimas las que se retienen en los rebaños con fines reproductivos hasta la etapa adulta.

Por otro lado, en los sistemas de cría ovina se utilizan prácticas rutinarias de manejos, que se ha demostrado son fuentes de estrés para los animales, tales como la esquila o el aislamiento social. Hasta el presente, la información

generada por el equipo de investigación en el que se enmarca esta tesis se centró en los efectos de la subnutrición intrauterina en fetos, neonatos, corderos juveniles y púberes, y adultas hasta los dos años de edad. En esta tesis, se plantea estudiar los efectos de desafíos ambientales estresantes (esquila y aislamiento social) en ovejas adultas (6 años) nacidas de madres que sufrieron restricción nutricional durante su gestación.

1.1. PROGRAMACIÓN FETAL

El concepto de programación fetal tiene su origen en estudios epidemiológicos realizados en humanos por el Dr. David Barker, quien indagó la génesis de algunos trastornos cardiovasculares y propuso que estos se originaban durante la vida fetal como consecuencia de mecanismos de adaptación del feto a la subnutrición materna durante la gestación (Barker, 2003). La hipótesis original de Barker respecto al origen fetal de las enfermedades ha sido ampliamente aceptada y extendida al desarrollo de varias patologías. De hecho, en la actualidad se acepta que patologías tales como la hipertensión, la diabetes mellitus tipo II y las enfermedades coronarias pueden guardar relación con la nutrición pre- y posnatal en su etiología (Moreno y Dalmau, 2001). La teoría de la programación fetal se basa en el hecho de que existen períodos específicos del desarrollo en los que un organismo es sensible a diferentes condiciones de su entorno (Marciniak et al., 2017). Cuando un feto se enfrenta a una situación de subnutrición ocurren procesos que alteran la estructura y la función de sus órganos para preservar el desarrollo de sus funciones vitales y promover su supervivencia (Alexander et al., 2015). Sin embargo, con el tiempo esta ventaja evolutiva se pierde y la respuesta a los desafíos ambientales se vuelve limitada. A este fenómeno se le llama «programación fetal» y se refiere a que los estímulos, cuando se aplican durante el desarrollo temprano de un individuo, generan cambios permanentes que se manifiestan en la etapa adulta (Calkins y

Devaskar, 2011). Sin embargo, debido a que la maduración de los diferentes órganos y sistemas se produce en momentos diferentes del desarrollo fetal, el efecto de la subnutrición intrauterina y qué órganos o funciones resulten afectadas dependerá del momento de la gestación en el que el efecto deletéreo suceda (Burton y Fowden, 2012).

Este tema ha cobrado gran relevancia por su impacto e implicaciones en humanos; hoy existe abundante literatura que demuestra que diversos factores deletéreos actuando sobre la programación fetal comprometen la salud y el bienestar de los individuos adultos (Kwon y Kim, 2017). También en especies productivas, como el ovino, la literatura demuestra distintos efectos que comprometen la capacidad productiva en los animales adultos, cuando las condiciones intrauterinas en la que se desarrollan los fetos son restrictivas (Lindsay et al., 2019, Du et al., 2015). Precisamente, el ovino es uno de los animales más utilizados en los estudios sobre programación fetal en las últimas décadas (Kenyon y Blair, 2014) debido a que la oveja gestante es un modelo que, en gran medida, asemeja las condiciones de una humana gestante (Anthony et al., 2003). En este sentido, los hitos o momentos relativos al desarrollo del feto en una oveja son similares a los del feto humano, y con su uso se elimina el riesgo de otras fuentes de variación, como cuando se usan especies politocas como los roedores y cerdos (Beede et al., 2019). Además, al tratarse de animales domesticados de mayor porte, permite un mayor volumen y frecuencia de muestreo de sangre/tejido, siendo el feto ovino tolerante a la manipulación quirúrgica (Beede et al., 2019, Anthony et al., 2003). Por otro lado, la oveja no es solo un modelo, sino que además tiene importancia por sí misma, ya que es uno de los rumiantes productivos de mayor interés.

1.2. SISTEMA PRODUCTIVO OVINO EN URUGUAY Y PROGRAMACIÓN FETAL

El sistema de cría ovina en Uruguay se caracteriza por estar basado en el pastoreo mixto de bovinos y ovinos sobre campo natural (Campos) a lo largo de todo el año. Los sistemas de producción ovina se concentran mayoritariamente en el litoral norte del país, el 69% de estos se distribuyen entre Salto, Artigas, Paysandú, Tacuarembó, Durazno y Cerro Largo (DIEA, 2021). En el norte de Uruguay predominan suelos arcillosos, con un índice de productividad (Coneat) menor a 90. En consecuencia, es muy probable que en estas condiciones existan limitaciones para que los ovinos expresen su máximo potencial productivo. Uruguay tiene un clima templado con baja frecuencia de eventos climáticos extremos como secas o temporales. Debido a su latitud, las horas luz varían de un máximo de 14 h 29 min en diciembre a un mínimo de 9 h 49 min en junio y presenta cuatro estaciones definidas por la temperatura. Estas condiciones determinan importantes variaciones en la tasa de crecimiento y calidad de las pasturas a lo largo del año (Berretta et al., 1994). En general, el valor nutritivo del campo natural es adecuado, pero presenta ciertas limitantes como la cantidad del forraje disponible y la distribución estacional de este. Esto trae como consecuencia una baja disponibilidad en las pasturas con aporte energético bajo, sobre todo en invierno, lo cual restringe el consumo de los animales a pastoreo (Carámbula, 1991). A este fenómeno se le conoce comúnmente como «crisis forrajera invernal» y determina que en invierno los animales que se alimentan exclusivamente de campo natural pierdan peso y condición corporal (Canany Uría, 1996, Montossi et al., 1996). La explicación de este fenómeno se encuentra en las especies que componen el tapiz del campo natural, ya que el 70% de estas son estivales, por lo que inician su crecimiento en primavera, cuando el fotoperíodo y la temperatura les permiten alcanzar su máxima tasa de crecimiento. Por otro lado, existe poca cantidad de especies invernales, lo cual

lleva a que la producción de forraje descienda abruptamente en este período (Olmos, 1997). Esta variación de la base forrajera sumada a la estacionalidad reproductiva de los ovinos frecuentemente provoca períodos de subnutrición en las ovejas gestantes. En efecto, el período de servicios más frecuente es en otoño y las pariciones mayoritariamente se producen a finales de invierno y principios de primavera. Por ello, parte de la gestación transcurre durante el período de menor disponibilidad de pasturas, que pueden no llegar a cubrir los requerimientos nutricionales de una oveja gestante sometidas a las demandas crecientes de la unidad feto/placentaria (Montossi et al., 1996). Bajo estas condiciones, es muy probable que las ovejas gestantes sufran un período de subnutrición con pérdida de peso y de condición corporal (Freitas-de-Melo et al., 2015) que pueda comprometer el desarrollo del feto, la sobrevivencia del cordero, su futuro potencial productivo, su salud y su bienestar.

1.3. PROGRAMACIÓN FETAL Y SUS EFECTOS SOBRE LA FISIOLOGÍA, EL COMPORTAMIENTO Y EL METABOLISMO OVINO

Un período de subnutrición en ovejas gestantes da como resultado corderos más livianos al nacer (Abud et al., 2020, Kenyon y Blair, 2014), los que, a su vez, tardan más tiempo en ponerse de pie e ingerir calostro (Freitas-de-Melo et al., 2015). La subnutrición en ovejas gestantes también afecta la formación de tejido adiposo en el feto (Budge et al., 2000) y, por tanto, la capacidad termorreguladora del cordero recién nacido (Mahboub et al., 2013). También se observan efectos en los animales adultos tanto en lo fisiológico como en lo comportamental. La subnutrición de las ovejas gestantes disminuye la actividad locomotora de las crías adultas (Donovan et al., 2013), altera la distribución del flujo sanguíneo en hembras de dos años de edad (Zócalo et al., 2020) y aumenta la frecuencia de alimentación de corderos lactantes (Freitas-de-Melo et al., 2017), adultos (Nielsen et al., 2013) y de ovejas envejecidas (Pérez-Clariget et al., 2023, George et al.,

2012). Aún más, modifica la preferencia por alimentos grasos (Pérez-Clariget et al., 2023, Nielsen et al., 2013) en la descendencia adulta. La restricción nutricional intrauterina afecta el metabolismo energético y la homeostasis de la glucosa-insulina en la descendencia en crecimiento (Ford et al., 2007) y adulta (Gardner et al., 2005, Oliver et al., 2002). Además, los corderos nacidos de ovejas subnutridas tienen una menor respuesta al estrés al destete (Freitas-de-Melo et al., 2017) y las crías adultas tienen concentraciones basales de cortisol más bajas (Bloomfield et al., 2003). En general, la literatura consultada confirma que un período de subnutrición materna durante la gestación en ovejas genera efectos a largo plazo en la fisiología, el metabolismo y el comportamiento de la descendencia al momento del nacimiento, durante la fase de crecimiento extrauterino y durante la vida adulta.

1.4. PROGRAMACIÓN FETAL Y SU EFECTO EN EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL OVINO

El eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical (HHA) puede ser alterado en forma permanente por la restricción nutricional intrauterina. La subnutrición materna reduce la respuesta de este eje a la administración de hormona liberadora de corticotropina (CRH) en fetos ovinos de 115 y 126 días de gestación (Hawkins et al., 1999). Corderos de dos meses de edad, hijos de madres restringidas nutricionalmente durante los primeros 30 días de gestación, responden con mayor secreción de cortisol a un desafío con CRH que los hijos de madres alimentadas de acuerdo a sus requerimientos (Chadio et al., 2007). Ovejas de 30 meses de edad, hijas de madres subnutridas durante 10 días en el último tercio de gestación, tienen menor concentración basal de cortisol, independientemente del peso al nacer o del peso al momento de la colección de la muestra (Bloomfield et al., 2003). Sin embargo, la concentración de hormona adrenocorticotropa (ACTH) y el área debajo de la curva luego de la administración de

CRH+vasopresina (AVP) o de insulina fue mayor que la del grupo control que en el restringido, lo que sugiere que una subnutrición corta en un momento clave del desarrollo fetal puede alterar en forma permanente la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Bloomfield et al., 2003).

1.5. ESTRÉS

Según Broom (1988), el estrés es un proceso por el cual los estímulos ambientales sobrepasan los sistemas de control de un individuo. Rivier y Rivest (1991) definen estrés como la respuesta de un organismo frente a una situación de amenaza que altera el equilibrio del medio interno (homeostasis). Sapolsky (2004) plantea que el estrés es un estado de desequilibrio homeostático desencadenado por estímulos conocidos como «estresores». Más adelante, Bartaburu (2007) definió estrés como la condición del animal que lo aparta de su rango de confort o bienestar, entendiéndose como bienestar animal al estado de salud mental y físico en armonía con el ambiente. Los estresores son los factores que desencadenan estrés y pueden ser clasificados en agudos (corta duración en el tiempo) o en crónicos (involucran una exposición más prolongada), y en físicos y psicosociales. Entre los estresores físicos se encuentran temperaturas extremas, ruidos molestos, ejercicio excesivo y falta de agua o alimento, entre otras (Grandin y Shivley, 2015). En la producción ovina, muchas de las prácticas tradicionalmente aceptadas como parte del manejo productivo son consideradas estresantes, como, por ejemplo: el descole y la castración, generalmente realizadas durante la señalada, el destete, el transporte, la exposición a ambientes desconocidos, la esquila y la utilización de perros, entre otros (Damián y Ungerfeld, 2013).

Diversos estudios han demostrado que el estrés puede tener impactos negativos en los ovinos. El estrés agudo en carneros (por transporte, temperaturas

extremas, electroeyaculación) afecta negativamente la secreción de testosterona y la calidad seminal (Damián y Ungerfeld, 2011, Ali et al., 2006), mientras que en las hembras se ha observado una disminución del desarrollo folicular y la producción de estradiol (Narayan y Parisella, 2017). Watson y Gill (1991) demostraron que el estrés producido por el destete incrementa la parasitosis por *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis* en corderos Merino destetados a las 8 semanas de edad. Más recientemente, Hayward et al. (2009) reportaron que las ovejas que experimentaron más estrés ambiental a lo largo de su vida tenían una mayor carga de parásitos. También se ha observado que el estrés crónico puede producir inmunosupresión, lo que aumenta el riesgo de contraer enfermedades infecciosas (Narayan y Parisella, 2017, Dohms y Metz, 1991).

La respuesta al estrés es muy variable y dependiente de la capacidad de cada individuo para responder al estresor. Cuando el animal se ve expuesto a uno o varios estresores, comienzan a activarse una serie de mecanismos fisiológicos como el eje simpático-adrenomedular y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Estos últimos son acompañados de una serie de cambios comportamentales, como aumento del desplazamiento, vocalización, disminución de la rumia, menor tiempo de descanso o menos tiempo comiendo (Dwyer y Bornett, 2004, Degabriele y Fell, 2001). Cuando los cambios mencionados anteriormente resultan insuficientes porque la situación de estrés se mantiene en el tiempo o es muy intensa, se pueden presentar consecuencias negativas sobre otras funciones fisiológicas, lo que puede comprometer el desempeño productivo del animal (Charmandari et al., 2005).

1.5.1. Respuesta al estrés agudo

Cuando un animal se ve expuesto a un estresor agudo, se activan de forma simultánea las respuestas del sistema nervioso simpático, que es la más rápida en observarse, y la del sistema endócrino, que, si bien demora más en visualizarse, es más prolongada en el tiempo (Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016). En conjunto, ambas respuestas producen una serie de cambios en el organismo que lo ayudan a adaptarse y responder al estresor (Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016, Charmandari et al., 2005, Johnson et al., 1992). Cuando se activa el sistema nervioso simpático, las células cromafines de la médula adrenal liberan catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) al torrente sanguíneo. Algunos de los efectos producidos por ellas son aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria, incremento de la temperatura rectal, estimulación de la glucogenólisis y, por ende, aumento de la glucemia, vasodilatación en la musculatura esquelética y vasoconstricción periférica (Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016, Wood y Walker, 2015, Cunningham y Bradley, 2008).

Cuando se activa el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (figura 1), el hipotálamo libera CRH que, a su vez, estimula la adenohipófisis a liberar ACTH. La ACTH estimula la secreción de glucocorticoides en la corteza de la glándula adrenal, siendo el cortisol el glucocorticoide predominante en rumiantes (Verbeek et al., 2019). Por ello, el aumento en las concentraciones sanguíneas de cortisol es uno de los indicadores más usados para evaluar el estrés. Luego de la acción del estresor(es), el cortisol alcanza valores máximos en sangre entre 10 y 20 min (vida media: 60 min), siendo metabolizado principalmente por el hígado (Moberg, 2000).

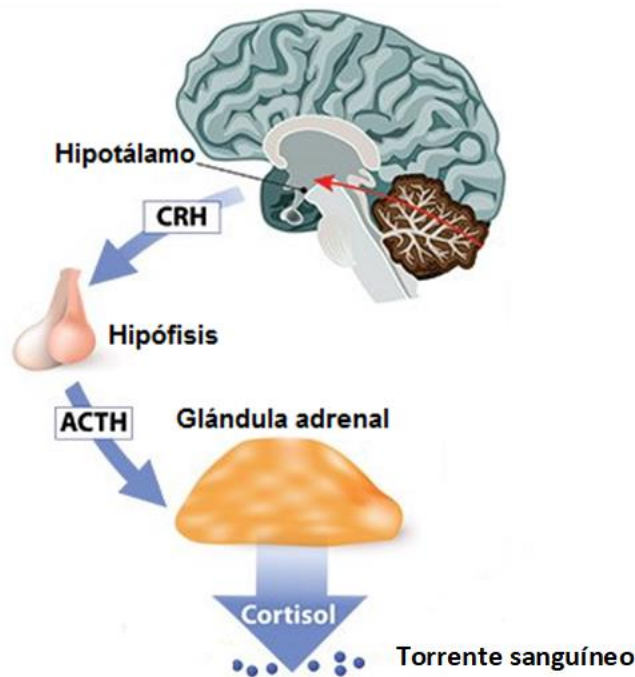


Figura 1: eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Fuente: adaptado de Konkel (2018)

Los glucocorticoides estimulan la gluconeogénesis y la glucogenólisis, lo que aumenta la glucemia, con lo que se dispone de más energía para que el animal pueda responder al estresor (Wood y Walker, 2015). Además de sus efectos catabólicos directos, los glucocorticoides inhiben la acción de la hormona del crecimiento (GH) y los esteroides sexuales sobre el catabolismo del tejido adiposo (lipólisis) y el anabolismo muscular y óseo (Chrousos, 2002). Los glucocorticoides también afectan la función de la glándula tiroides al inhibir la enzima yodotironinadesyodasa que convierte la tiroxina (T4) en triyodotironina (T3) (Mizokami et al., 2004). Además, tienen una acción en el sistema inmune: provocan linfopenia, eosinopenia y neutrofilia (Yada y Tort, 2016). La activación del eje HHA tiene un importante efecto inhibitorio sobre la respuesta inmune/inflamatoria debido a que prácticamente todos los componentes de la respuesta inmune son inhibidos por los glucocorticoides. En la célula, los

principales efectos inmunosupresores de los glucocorticoides incluyen alteraciones en el tráfico y la función de los leucocitos, disminuciones en la producción de citocinas y mediadores de la inflamación e inhibición de su acción (Charmandari et al., 2005). Los glucocorticoides también ejercen un efecto inhibitorio sobre la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y hacen que los tejidos diana de los esteroides gonadales sean resistentes a estas hormonas, lo que afecta, por tanto, el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal en varios niveles (Chrousos et al., 1998). Con el cese del estresor y como parte del mecanismo de control del propio eje, ocurre una retroalimentación negativa, donde los propios glucocorticoides inhiben la secreción de CRH y ACTH. Esta retroalimentación negativa sirve para limitar la duración de la exposición tisular total del organismo a los glucocorticoides, lo que minimiza los efectos catabólicos, lipogénicos, antirreproductivos e inmunosupresores de estas hormonas (Verbeek et al., 2019).

1.5.2. Respuesta al estrés crónico

Cuando un animal es expuesto a estresores durante períodos prolongados, de forma continua o intermitente, la exposición sostenida a los glucocorticoides produce efectos deletéreos sobre el desempeño productivo y el bienestar del animal (Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016). El aumento crónico de la secreción de glucocorticoides ocasiona una reducción del comportamiento sexual y del apetito, pérdida de peso y deterioro de la calidad de la lana/pelo, y de su desempeño reproductivo (Sapolsky, 2004). La exposición a un estrés crónico también se asocia con un aumento de la adiposidad visceral y una disminución del tejido corporal magro (hueso y músculo) (Tritos et al., 2011). La activación prolongada del eje HHA y la secreción de glucocorticoides conducen a la inhibición de la secreción de la GH y de múltiples factores de crecimiento como el factor insulinosímil tipo I (IGF-I) (Burguera et al., 1990). Además, se ha demostrado que las altas concentraciones de glucocorticoides pueden producir

inmunosupresión y, por tanto, aumentar la susceptibilidad a enfermedades (Yada y Tort, 2016).

El estrés crónico puede ser evaluado a través de las concentraciones de cortisol en el pelo/lana o mediante la medición de algunos marcadores bioquímicos como el incremento de la albúmina, proteínas totales y VGA (indicadores de deshidratación y/o hemoconcentración) (Ghassemi Nejad et al., 2020, Stubsjøen et al., 2015). También se puede evaluar el estrés crónico a través de indicadores de disminución o ausencia de consumo de alimento como el incremento en las concentraciones sanguíneas de ácidos grasos no esterificados, β -hidroxibutirato, urea o la disminución de la glucosa, o indicadores de esfuerzo físico como el incremento de la actividad de creatinfosfoquinasa (CK) o de las concentraciones de lactato (Romero Peñuela et al., 2011).

En conclusión, el estrés crónico es una condición de mala adaptación al desafío que puede asociarse con una reducción directa en el nivel de bienestar del animal. Si bien la respuesta de estrés es beneficiosa para el animal porque le permite adaptarse y responder rápidamente ante una situación nueva, cuando el estresor se sostiene en el tiempo, el resultado final de la respuesta de estrés puede ser más perjudicial que beneficiosa para el propio animal (Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016) y se la conoce como distrés.

1.6. TERMORREGULACIÓN EN ANIMALES HOMEOTERMOS

La vida animal se ha desarrollado en el planeta a partir de procesos evolutivos que permitieron la adaptación de los animales a las condiciones ambientales. La regulación de la temperatura interna o termorregulación es considerada uno de los aspectos más importantes en la adaptación y evolución de los animales (Liedtke, 2017). En la mayoría de los casos, existen límites sobre la temperatura

interna que un organismo debe tener para poder sobrevivir, ya que, por debajo de 0°C, el agua se congela, lo que produce la formación de cristales de hielo en el interior de las células, lo cual rompería sus membranas, y por arriba de 45°C comenzarían a desnaturalizarse las enzimas del organismo (Romanovsky, 2018). En términos generales, los animales pueden dividirse en dos grupos según los mecanismos que utilizan para regular su temperatura corporal. En el caso de los ectotermos, la temperatura corporal depende principalmente de fuentes de calor externas, variando con la temperatura del ambiente (Cena et al., 1986). En cambio, los animales endotermos, entre los que se encuentran los mamíferos, tienen una actividad metabólica que genera calor, siendo fundamental para el control de la temperatura corporal. La generación del calor metabólico, conjuntamente con otros procesos de intercambio de calor con el medio ambiente, posibilitan mantener la temperatura corporal dentro de un rango considerado normal para cada especie (Cena et al., 1986).

Una fuente fundamental de calor en los animales homeotermos es la tasa metabólica, que se define como la cantidad de energía que gasta un animal durante un período específico (Glazier, 2015). La tasa metabólica es altamente variable de acuerdo a factores tales como la edad, el sexo, el peso, el tamaño, la actividad física (animales más activos tienen una tasa metabólica mayor que animales menos activos), la temperatura ambiente, la hora del día, la época del año y la alimentación (Shrestha et al., 2020, Pettersen et al., 2018, White y Kearney, 2013). En general, los animales más pequeños tienen una tasa metabólica más alta y tienden a perder más calor, ya que tienen mayor superficie expuesta en relación con su volumen (Pettersen et al., 2018, Glazier, 2015). Finalmente, la tasa metabólica se incrementa cuando aumenta la temperatura y disminuye a medida que la temperatura desciende, debido a que la velocidad de las reacciones enzimáticas se relaciona con la temperatura corporal (Glazier, 2015).

1.6.1. Intercambio de calor entre el cuerpo y el medioambiente

Hay cuatro formas principales en las que un organismo puede intercambiar calor con el ambiente: conducción, convección, radiación y evaporación (figura 2). La conducción es el calor que se trasfiere entre objetos que se encuentran en contacto directo (Gates,2012). Según la ley de enfriamiento de Newton, el calor trasferido entre dos o más objetos en contacto directo es proporcional a la diferencia entre las temperaturas superficiales de los objetos y se dirige desde el objeto de mayor temperatura hacia el de menor temperatura (Romanovsky, 2018). La cantidad de calor intercambiado por conducción depende del área de contacto, por lo que modificar la superficie del cuerpo expuesta al medio ambiente permite modular el intercambio de calor con este (Badarnah et al., 2010). En especies gregarias expuestas al frío, es común observar cómo disminuye la distancia entre los individuos con el objetivo de reducir la cantidad de superficie expuesta de cada animal al ambiente, lo que permite el intercambio de calor entre individuos. De esta forma, los animales adquieren las ventajas térmicas de un animal más grande y aumenta su resistencia al frío (Yáñez-Pizaña et al., 2020, Manteca, 2009).

La convección es el fenómeno mediante el cual el calor se trasfiere por el movimiento de un líquido o del aire (Gates,2012). Debido a que el cuerpo siempre está expuesto al aire, el intercambio de calor entre el cuerpo y el ambiente se ve afectado por convección. Además, la convección es modificada por el gradiente de temperatura ambiental y por factores como el movimiento del cuerpo o del viento. En este sentido, el movimiento reemplaza las capas de aire que están adyacentes al cuerpo, que tienen una temperatura cercana a la temperatura superficial de la piel, con capas nuevas y lejanas, que tienen la temperatura del entorno diferente (Gates, 2012).

La radiación es la transferencia de calor desde un objeto más caliente a uno más frío por radiación infrarroja, es decir, sin contacto directo. Todos los objetos emiten y absorben continuamente energía en forma de ondas electromagnéticas (Gates, 2012). Según la ley de Stefan-Boltzmann, la cantidad de energía radiada es proporcional a la cuarta potencia de la temperatura absoluta y a la emisividad (capacidad de emitir o absorber radiación) de la superficie de un objeto (Romanovsky, 2018). Muchos comportamientos tienen como finalidad modular el intercambio de calor por radiación. Por ejemplo, un animal se siente más caliente en un ambiente abierto que en la sombra debido a la radiación del sol, aunque ambas áreas tengan la misma temperatura del aire (Badarnah et al., 2010).

La evaporación es la pérdida de calor por la vaporización del agua en la superficie del animal (Romanovsky, 2018). El enfriamiento por evaporación está ampliamente extendido en la naturaleza, ya que diferentes animales utilizan la sudoración (primates o equinos), el jadeo (ovinos, cánidos), y la dispersión de saliva sobre la superficie del cuerpo (roedores) para refrescarse (Badarnah et al., 2010). La evaporación no solo es el mecanismo más eficiente para perder calor, sino que también es el único mecanismo que puede funcionar cuando la temperatura ambiente es mayor que la temperatura superficial de la piel. Sin embargo, la evaporación puede tener consecuencias importantes, ya que disminuye la cantidad de agua del organismo, lo que puede llevar a la deshidratación, por lo que los mecanismos termorreguladores que dependen de la evaporación se activan más tarde en comparación con los descritos anteriormente (Romanovsky, 2018).

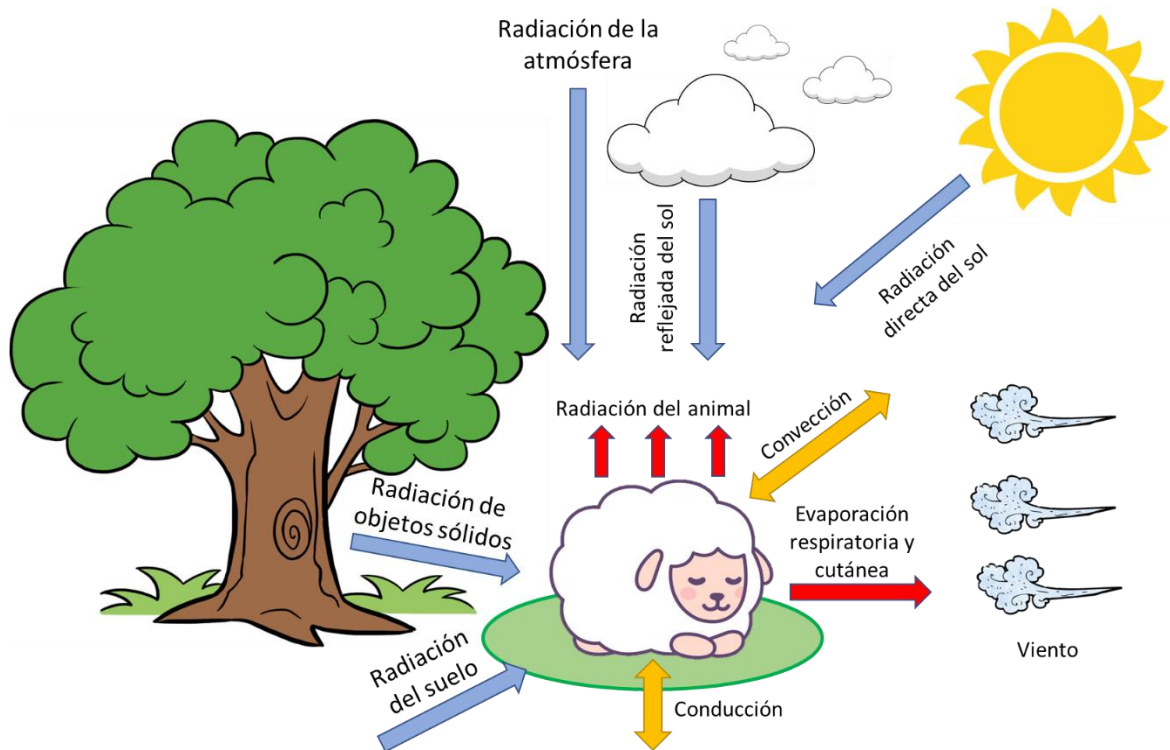


Figura 2. Intercambio de calor entre un animal homeotermo y el medioambiente

1.6.2. Temperatura corporal (núcleo y periferia)

Comúnmente se entiende como la temperatura del núcleo o temperatura central del cuerpo a las temperaturas del cerebro y los órganos que conforman la cavidad torácica y abdominal. Si bien existen pequeñas diferencias de temperatura entre dichos órganos, se considera que la temperatura central es homogénea y muy estable en todos los animales homeotermos (Hymczak et al., 2021, Romanovsky, 2007). En términos prácticos, se considera que la temperatura rectal es una medida representativa de la temperatura central de los animales. En los ovinos, la temperatura central varía entre 38,3 °C y 39,9 °C (Moran y Mendal, 2002). El núcleo termogénico está rodeado por el caparazón o periferia que, al contrario

de la anterior, es de naturaleza heterogénea, más variable, y puede llegar a temperaturas por arriba de la temperatura ambiente o por debajo de la temperatura del núcleo/central (Vriens et al., 2014). Dentro de las estructuras que conforman este caparazón, la más externa e importante es la piel, ya que es un órgano que sirve como barrera protectora entre el ambiente y el organismo (Romanovsky, 2014). Muchas respuestas fisiológicas, como la vasodilatación, la piloerección o la sudoración, tienen como finalidad modificar la temperatura superficial de la piel (Badarnah et al., 2010). La piel también es el órgano sensorial más grande en los animales y es muy rico en termorreceptores, siendo fácilmente accesible para la termometría. Debido a esto, medir la temperatura de la piel es el método más utilizado para conocer la temperatura de la periferia (Romanovsky, 2014).

1.7. AISLAMIENTO SOCIAL COMO UN DESAFÍO PARA EVALUAR LAS CONSECUENCIAS DE LA ALTERACIÓN DE LA PROGRAMACIÓN FETAL EN OVEJAS ADULTAS

Dado que los ovinos son animales gregarios, separarlos de su grupo social desencadena respuesta de estrés (Boissy et al., 2005). La prueba conocida como test de aislamiento social (TAS) u *open field test* es un método estandarizado que se utiliza para evaluar la respuesta al estrés por aislamiento social. Esta prueba fue utilizada por primera vez en roedores (Hall, 1936, 1934) y posteriormente fue validada en varias especies productivas (Forkman et al., 2007). En esta prueba, las ovejas son introducidas en un ambiente que puede ser conocido o no y son completamente aisladas de otros individuos del grupo durante un período previamente determinado. Las ovejas socialmente aisladas muestran respuestas conductuales indicativas de estrés, como un aumento en la locomoción y en el número de vocalizaciones, de micciones y defecaciones (Freitas-de-Melo et al., 2022, Doyle, 2017). También se han reportado alteraciones en sus parámetros

fisiológicos normales, como el incremento de la frecuencias cardíaca y respiratoria y de las temperaturas rectal y superficial (Damián et al., 2018, Freitas-de-Melo et al., 2016), así como un aumento en las concentraciones de cortisol, ACTH y catecolaminas (Parrott et al., 1988, Moberg, 1987).

La nutrición intrauterina modifica la respuesta al TAS. En ratas, la subnutrición intrauterina provoca un aumento en las defecaciones y una disminución en las conductas exploratorias en la descendencia adulta sometidas al TAS (Simonson et al., 1971). Más recientemente, Illa et al. (2017) encontraron que crías de conejas que recibieron el 70% de sus requerimientos nutricionales a partir del día 22 de gestación presentaron una mayor latencia para empezar a moverse y una menor frecuencia de comportamientos exploratorios durante el TAS. En hembras ovinas gestadas por madres subnutridas se observó una disminución de los intentos de escape y de las concentraciones de cortisol luego de un TAS realizado a los 4 y 18 meses de edad (Hernandez et al., 2010). Por otro lado, los corderos nacidos de madres restringidas nutricionalmente caminaron menos tiempo que los corderos del grupo control durante el TAS (Abecia et al., 2014). No se encontró literatura sobre el efecto de la restricción nutricional intrauterina en la respuesta al TAS en ovejas en la etapa adulta avanzada.

El TAS puede realizarse solo o en combinación con otras pruebas que evalúan miedo y respuesta al estrés. En general, que un factor desencadene una respuesta de miedo depende de la novedad y de las características físicas de su presentación, así como del movimiento, la intensidad, la duración, la brusquedad o la proximidad del factor desencadenante (Gray, 1987). Para medir la respuesta al miedo en las ovejas, se han validado diferentes tipos de pruebas. Dos de las más utilizadas son la prueba sorpresa y la prueba de objeto novedoso, que consiste en confrontar a los animales con un estímulo novedoso y repentino, comúnmente un objeto desconocido (Romeyer y Bouissou, 1992). En general, en

los estudios realizados en ovejas con estas modificaciones se reportó una disminución de la conducta exploratoria y un aumento de las conductas que indican miedo, como intentos de escape, vocalización y defecación (Forkman et al., 2007, Désiré et al., 2004).

El efecto de la subnutrición intrauterina sobre la respuesta al TAS con objeto novedoso es motivo de controversia en la literatura. Abecia et al. (2014) no observaron efectos de la subnutrición materna en la respuesta a la prueba del objeto novedoso en corderos. Por el contrario, Erhard et al. (2004) encontraron que los corderos nacidos de madres subnutridas expuestos a la prueba de novedad y sorpresa mostraron mayores latencias para acercarse al objeto nuevo, fueron más propensos a saltar y presentaron mayores niveles de locomoción. No se encontró literatura sobre el efecto de la subnutrición intrauterina en la respuesta a la prueba de sorpresa y prueba de objeto novedoso en ovejas adultas.

1.8. LA ESQUILA COMO UN DESAFÍO PARA EVALUAR LAS CONSECUENCIAS DE LA PROGRAMACIÓN FETAL EN OVEJAS ADULTAS

La esquila (cosecha anual del vellón) es una actividad fundamental dentro del sistema de producción de ovinos de lana. Se realiza anualmente siguiendo un calendario en el cual la fecha de esquila varía según la finalidad productiva de los ovinos y la demanda del mercado. En ovejas, las dos épocas de esquila más comunes son: la esquila de primavera o tradicional, que coincide con el período de lactación de los corderos, momento en el cual la disponibilidad de alimento es mayor, o la esquila preparto o de invierno, que puede ser temprana, a los 70 días de gestación, o tardía, a los 120 días de gestación (De Barbieri et al., 2014, Montossi et al., 2005, Bianchi y Olascoaga, 1995). El método de esquila más

utilizado es el método Tally-Hi, en el cual se realiza la remoción del vellón sin atar al animal, siendo, por tanto, una práctica mucho menos estresante y rápida que la esquila tradicional (Maggiolo, 1994).

La esquila es un evento estresante que tiene varios componentes. Por un lado, está el manejo relacionado a la esquila, el movimiento de los animales hasta el corral, ruidos y movimientos vinculados a la esquila de los otros animales, manipulación e inmovilización durante la esquila en un entorno desconocido y la esquila en sí misma (Ungerfeld et al., 2021). También, se produce un estrés térmico generado por la pérdida de la capa naturalmente aislante del ovino, en especial cuando se realiza en invierno (Aleksiev, 2009). Por todo lo anterior, la esquila produce cambios fisiológicos como un aumento de la concentración plasmática del cortisol (Carcangiu et al., 2008) y de la glucemia (Aleksiev, 2009). La temperatura de los animales se incrementa durante varias semanas luego de la esquila (Piccione et al., 2002), así como también se reporta una disminución de los neutrófilos (Aleksiev, 2009) y un aumento del consumo voluntario (Mousa-Balabel y Salama, 2010). También se observaron importantes aumentos de la frecuencia cardíaca y del pulso luego de la esquila (Mousa-Balabel y Salama, 2010). Durante el período inmediato posterior a la esquila aumenta el despliegue de comportamientos de confort y el consumo de alimento y disminuye la frecuencia de beber agua (Mousa-Balabel y Salama, 2010). Además, Ungerfeld et al. (2018) reportaron que, en ovejas en pastoreo, luego de esquiladas, aumenta el tiempo de pastoreo y disminuye el tiempo de reposo. También se reportó que la esquila genera menores cambios en el comportamiento y en el estatus fisiológico de las ovejas preñadas que en las vacías (Ungerfeld y Freitas-de-Melo, 2019).

Con respecto a la esquila y su efecto en animales que fueron gestados por madres subnutridas, se ha reportado que un período de subnutrición en ovejas

gestantes compromete la disposición de grasa parda en el feto y, como consecuencia, la capacidad termorreguladora del neonato (Mahboub et al., 2013, Budge et al., 2000). Además, la programación fetal por subnutrición afecta la capacidad termorreguladora de ratas hijas de madres que fueron restringidas durante la gestación (Luz et al., 2003, Tonkiss et al., 2003) y en humanos recién nacidos (Salam et al., 2014, Longo et al., 2013). Sin embargo, no se encontró literatura referente a los efectos de un período de subnutrición durante la gestación en la termorregulación en ovinos adultos. Por tanto, la esquila es un modelo que integra respuestas fisiológicas, metabólicas, comportamentales y termorregulatorias, teniendo componentes de estrés agudo y crónico, y desafía a los animales a una respuesta integrada, siendo al mismo tiempo parte de los manejos rutinarios en producción ovina. Por ello, constituye un excelente modelo experimental para estudiar este tipo de respuestas en ovejas adultas que sufrieron restricción nutricional intrauterina.

1.9. ANTECEDENTES NACIONALES DE INVESTIGACIÓN SOBRE PROGRAMACIÓN FETAL EN OVINOS

En la literatura internacional se reporta que la subnutrición materna durante la gestación en los ovinos altera el desarrollo intrauterino, lo que disminuye el peso al nacer y la probabilidad de supervivencia de las crías (Roca Fraga et al., 2018, Kenyon y Blair, 2014) y afecta negativamente los resultados productivos (Zhu et al., 2004). En este sentido, en el ámbito nacional se desarrolla una línea de investigación que incluye trabajos en programación fetal en ovinos tanto en condiciones controladas como en pastoreo. Bielli et al. (2002) encontraron que el número de células de Sertoli disminuye al reducir la cobertura de los requerimientos energéticos de 110 % a 70 %. Abud et al. (2020) reportaron que las ovejas que pastorean sobre una oferta de forraje de campo natural baja desde 23 días antes de la concepción hasta el día 122 de gestación producen corderos

más livianos, con una relación peso del cerebro/peso del hígado mayor e hígados y glándulas adrenales más livianos (Abud et al., 2020).

También se observaron efectos de la baja oferta de forraje sobre el desarrollo muscular en fetos de 70 días (Ithurralde et al., 2020), una limitación en el desarrollo de la masa muscular durante el período de engorde (Ithurralde et al., 2019), y las características de la carne en los corderos al momento del sacrificio (Ithurralde et al., 2021). Asimismo, la baja oferta de forraje durante la gestación indujo algunos cambios en el comportamiento de los corderos recién nacidos; de hecho, los corderos machos restringidos maman más tarde, lo que se vincula con menor probabilidad de supervivencia (Freitas-de-Melo et al., 2015) y pastorean menos tiempo durante el período de lactación (Freitas-de-Melo et al., 2017).

Las crías hembras nacidas de madres restringidas durante la gestación presentaron una mayor resistencia en la arteria carótida a los 2,5 años de edad, lo que probablemente se vincula con una mayor resistencia en la microcirculación cerebral (Zócalo et al., 2020). Más recientemente, Pérez-Clariget et al. (2023), trabajando con las mismas ovejas que se utilizan en los experimentos de esta tesis, encontraron que las ovejas que habían sido gestadas por madres restringidas preferían los alimentos grasos por sobre los proteicos, además de ser hiperfágicas. Por último, Jorge-Smeding y Pérez-Clariget (2021) reportaron que las ovejas hembras nacidas de madres que pastorearon baja oferta presentaron diferencias en el metaboloma sanguíneo con respecto a las hijas de madres que pastorearon alta oferta.

2. HIPÓTESIS GENERAL

La subnutrición materna durante la gestación afecta las respuestas fisiológicas, comportamentales y termorregulatorias de su progenie en la etapa adulta frente a diferentes desafíos ambientales (esquila y TAS + objeto novedoso).

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la restricción nutricional durante la gestación en ovejas afecta las respuestas fisiológicas, comportamentales y termorregulatorias de la descendencia adulta frente a diferentes desafíos ambientales (esquila y TAS + objeto novedoso).

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar si ovejas adultas, no gestantes ni lactantes, hijas de madres que sufrieron subnutrición durante la gestación presentan cambios:

- comportamentales, fisiológicos y en su capacidad termorreguladora, luego de la esquila en primavera;
- comportamentales y fisiológicos luego de un período corto de aislamiento social y presentación abrupta de un objeto novedoso.

4. ESTRUCTURA DE LA TESIS

La estructura central de la presente tesis se basa en dos artículos científicos: el primero, cuyo título es «Thermoregulatory, metabolic and stress responses to spring shearing of aged ewes born to undernourished mothers», publicado en *Journal of Thermal Biology* (Corrales-Hlinka, F., Freitas-de-Melo, A., Ungerfeld, R., y Pérez-Clariget, R., 2023. *J. Therm. Biol.*, 113. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2023.103503>.), constituye el capítulo V. El segundo manuscrito, cuyo título es «Stress response to social isolation followed by exposure to a novel object of aged ewes born to undernourished mothers», fue enviado a *Behavioural Processes* y se encuentra en proceso de publicación.

Ambos estudios se llevaron a cabo en la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt de Facultad de Agronomía (Cerro Largo). En el primero se utilizaron 19 ovejas de seis años de edad no gestantes y no lactantes, y en el segundo las mismas 19 ovejas más una más que fue incorporada al grupo experimental. Todas las ovejas nacieron de parto simple en la primavera de 2013. Las ovejas eran hijas de madres que desde los 23 días antes de la concepción hasta el día 122 de gestación pastorearon sobre campo natural (Campos) a dos ofertas de forraje contrastantes (10-12 kg MS/100 kg de peso vivo (PV)/día vs. 5-8 kg MS/100 kg PV/día). Se utilizaron la esquila y el TAS con la presentación de un objeto novedoso como desafíos ambientales. Se utilizaron una amplia gama de indicadores fisiológicos, comportamentales y metabólicos como variables de respuesta. El primer estudio se llevó a cabo durante la primavera (setiembre-octubre) de 2019, y, el segundo, al final del verano-principios de otoño (marzo) de 2020. Por último, la tesis incluye una discusión de los resultados de ambos trabajos (Discusión general) que corresponde al capítulo VII.

5. THERMOREGULATORY, METABOLIC AND STRESS RESPONSES TO SPRING SHEARING OF AGED EWES BORN TO UNDERNOURISHED MOTHERS

Florencia Corrales Hlinka¹; Aline Freitas-de-Melo²; Rodolfo Ungerfeld²; Raquel Pérez-Clariget^{1*}

¹Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay

²Departamento de Biociencias Veterinarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay

5.1. RESUMEN

La subnutrición materna durante la gestación afecta el comportamiento, el metabolismo y la sensibilidad al estrés de la descendencia. La esquila es un factor estresante que desencadena cambios fisiológicos, comportamentales y termorregulatorios en las ovejas. El objetivo de este estudio fue comparar las respuestas termorregulatoria, metabólicas y comportamentales a la esquila de primavera de ovejas adultas nacidas de madres que pastorearon diferentes ofertas de forraje de campo natural durante la gestación. Se utilizaron 19 ovejas Corriedale de seis años de edad, no gestantes, nacidas de madres que pastorearon dos ofertas contrastantes de campo natural desde los 23 días antes de la concepción hasta los 122 días de gestación. La oferta de forraje ofrecida a las madres fue de 10-12 kg de materia seca (MS)/100 kg de peso vivo (PV)/día (grupo AOF; n=11) o de 5 -8 kg MS/100 kg PV/día (grupo BOF; n=8). A los 6 años de edad, la progenie de ambos grupos experimentales fue esquilada durante la primavera (Día 0). Luego de la esquila fueron trasladadas a un potrero en donde

pastorearon campo natural a una oferta de 10 kg MS/100kg/día. Antes y después de la esquila (Días -3 al 4, 13 y 14, 21 y 22, 29 y 30) se registraron los comportamientos parada, echada, caminando, comiendo y rumiando. La temperatura superficial máxima, mínima y media de ojo izquierdo, oreja izquierda, hocico y vulva y la temperatura rectal de todas las ovejas se registraron los Días -4, 5, 15, 23 y 31. Los mismos días y luego de los registros de temperatura, se extrajo sangre para la obtención de suero y se determinaron las concentraciones de albúmina, proteínas totales, glucosa e insulina. Las ovejas BOF tuvieron temperaturas superficiales máximas y mínimas en la oreja y el hocico inferiores que las AOF antes de la esquila ($P < 0,05$). El Día 15, la temperatura promedio de la superficie de la vulva fue más baja en las ovejas BOF que en las ovejas AOF ($P < 0,05$). Después de la esquila, la proporción de tiempo rumiando fue mayor en las ovejas AOF que en las BOF ($P = 0,01$). Después de la esquila, las ovejas BOF estuvieron más frecuentemente paradas que las ovejas AOF ($P < 0,0001$). La concentración de insulina tendió a ser mayor en las ovejas BOF que en las AOF ($P = 0,06$). En conclusión, la subnutrición materna durante la gestación modificó las respuestas termorregulatorias y el comportamiento inmediato tras la esquila en crías hembras en etapa adulta avanzada, mientras que el metabolismo fue afectado en menor medida.

5.2. ABSTRACT

Maternal undernutrition during gestation affects the behaviour, metabolism, and sensitivity to stressors of the offspring. Shearing is a stressor that triggers physiological and behavioural changes and augments the thermoregulatory demands in sheep. The aim of this study was to compare the thermoregulatory, metabolic, and behavioural responses to spring shearing of aged ewes born to mothers who grazed different pasture allowances during gestation. Nineteen non-gestating six-year-old Corriedale ewes born to mothers who grazed two pasture allowances from 23 days before conception until 122 days of gestation were used. The pasture allowance offered to the mothers was high [HPA group; n=11; 10-12 kg of dry matter (DM)/100 kg of body weight (BW)/day] or low [LPA group: n=8; 5-8 kg of DM/100 kg of BW/day]. The adult offspring of both experimental groups were sheared during spring (Day 0), and remained outdoors, grazing natural grassland, and the behaviour, the surface temperature and the rectal temperature were recorded. Blood concentrations of albumin, total protein, glucose, and insulin were also determined. Data were compared with a mixed model. The LPA ewes had lower ear and nose maximum and minimum surface temperatures before shearing ($P < 0.05$). On Day 15, the average surface temperature of the vulva was lower in LPA than in HPA ewes ($P < 0.05$). After shearing, rumination frequency was greater in HPA than in LPA ewes ($P = 0.01$), and LPA ewes were observed more time standing up than HPA ewes ($P < 0.0001$). Insulin concentration tended to be greater in LPA than HPA ewes ($P = 0.06$). Maternal undernutrition during gestation modified the thermoregulatory responses and the acute behavioural changes after shearing in aged female offspring, whilst the metabolism was affected to a lesser degree. The long-term effects noticed in this study highlight the importance of providing proper nutrition to pregnant ewes.

Keywords: ruminant, sheep, foetal programming, grazing behaviour, thermoregulation

5.3. INTRODUCTION

In extensive pastoral production systems, sheep breeding flock nutrition relies on natural grassland availability and quality. During winter, the pasture's growth rate and quality are insufficient to fulfil the energy and protein requirements of pregnant ewes (Freitas-de-Melo et al., 2018). Consequently, ewes frequently undergo periods of gestational subnutrition, which can be associated with foetal intrauterine growth restriction (Nathanielsz and Hanson, 2003; Abud et al., 2020). Accordingly, maternal underfeeding results in lighter lambs at birth (Abud et al., 2020), therefore, taking longer for lambs to stand up and ingest colostrum (Dwyer et al., 2003; Freitas-de-Melo et al., 2015). Undernutrition of pregnant ewes also compromises the brown adipose tissue deposition in the fetal lamb (Budge et al., 2000) and the thermoregulatory capacity of the newborn (Mahboub et al., 2013). The effects of maternal subnutrition on the offspring' physiology and behaviour persist into adulthood. Subnutrition of pregnant ewes decreases the locomotor activity of adult offspring, and might perhaps reduce their resting metabolic rate (Donovan et al., 2013). The blood flow is distributed differently in adult ewes born to undernourished mothers compared to better fed mothers (Zócalo et al., 2019). Therefore, heat exchange between the body surface and its surroundings might also differ in adult offspring born to underfed pregnant ewes. Prenatal undernourishment also increases the feeding frequency of suckling lambs (Freitas-de-Melo et al., 2017), adults (Nielsen et al., 2013), and aged ewes (George et al., 2012; Pérez-Clariget et al., 2021). Subsequently, food restriction during gestation affects the energetic metabolism and the glucose-insulin homeostasis in the adult offspring (Oliver et al., 2002; Gardner et al., 2005; Ford et al., 2007). Furthermore, lambs born to undernourished ewes have a lower

stress response at weaning (Freitas-de-Melo et al., 2017), and adult offspring have lower baseline cortisol concentrations (Bloomfield et al., 2003). Overall, maternal undernutrition during gestation presents long-term effects on the offspring's physiology, metabolism, and behaviour.

Wool ewes are annually sheared, inducing acute stress responses as whilst the fleece is removed, ewes are restrained, exposed to unfamiliar humans, and different sounds and movements of other animals (Ungerfeld and Freitas-de-Melo, 2019; Arfuso et al., 2022). Immediately after shearing, thermoregulatory demands of ewes increase as their lower critical temperature rises from -4 to 20 °C (Nicol and Brookes, 2007). The mean minimum ambient temperature during spring in grazing areas in Uruguay rarely exceeds 17.0 °C (INUMET, 2020). Therefore, after spring shearing, both ewes' metabolisable energy requirement and the metabolic rate for maintenance increase to avoid a drop in body temperature (Nicol and Brookes, 2007). In response to the increased energetic demands, sheared ewes augment their time grazing and standing up, and reduce their time lying down (Ungerfeld et al., 2018). Shearing increases glucose intake (Symonds et al., 1988b), cortisol, thyroxine, NEFAs and total protein blood concentrations (Symonds et al., 1988a; Ungerfeld et al., 2018), and decreases insulin concentration and glucose clearance after a hyperglycemic challenge (Revell et al., 2000). In recent years, detrimental effects of thermal stressors on animal health and welfare have been studied, using behavioural, physiological and biochemical indicators to evaluate the adaptive capacity of animals (Fazio et al., 2018; Carcangiu et al., 2018; Giannetto et al., 2017). We hypothesised that nutrient restriction during foetal development affects the thermoregulation capacity, metabolism, and behavioural pattern of the aged female offspring to spring shearing. Therefore, the aim was to compare those responses of aged ewes born to mothers who grazed different pasture allowances during gestation to spring shearing.

5.4. MATERIALS AND METHODS

5.4.1. Location

The study was conducted at the Estación Experimental Bernardo Rosengurtt, Facultad de Agronomía (Cerro Largo, Uruguay; 32 °35´ S, 54 °15´ W), Uruguay.

5.4.2. Nutritional treatments applied to the mothers during gestation

The nutritional treatments applied to the mothers of the ewes used in the present study were described in detail by Freitas-de-Melo et al. (2015) and Abud et al. (2020). Briefly, multiparous single-bearing Corriedale ewes were used in a complete randomised block design with two treatments and three plots. Ewes were born to mothers that grazed on high pasture allowance (10–12 kg of dry matter (DM)/100 kg of body weight (BW)/day; group HPA) or low pasture allowance (5–8 kg of DM/100 kg of BW/day; group LPA) from 23 days before conception until 122 days of gestation. Pregnant mothers were sheared on day 122 of gestation, and after that, they grazed on *Festuca arundinacea* (14 kg DM/100 kg BW/day) until lambing. From day 116 of gestation until lambing, each pregnant ewe was supplemented with 200 g/day of rice bran (88% DM, 14% crude protein, 9% acid detergent fibre, 24% neutral detergent fibre) and 50 mL of glycerine/day (77% glycerol). The energy requirements of HPA ewes were fulfilled during the entire gestation. The LPA ewes were in negative energy balance from 22 days before conception to day 122 of gestation (covering only 74% and 84% of the energy requirements). Both groups of ewes underwent periods of negative protein balance, but it was more intense and prolonged in LPA ewes. The HPA ewes were in negative protein balance from day 59 to day 122 of gestation

(covering 83% and 69% of the energy requirements). The LPA ewes were in negative protein balance from day 25 to day 122 of gestation (covering 70% and 50% of the energy requirements). During the whole period of the treatment, energy and protein balance differed between HPA and LPA groups by 28% and 21%, respectively.

From lambing until weaning, the ewes and their lambs grazed on natural grassland as a single group. Lambs were weaned at 90 days of age. From then until the present study, only female lambs remained in the flock as a single group grazing on natural grassland, receiving the same reproductive, nutritional, and health management. These ewes were used in other experiments, including the work conducted by Zócalo et al. (2019), so they were accustomed to human handling and local facilities. The experimental ewes were sheared five times during their life.

5.4.3. Animals, shearing procedure, and management

Eleven HPA and 8 LPA non-lactating six-year-old Corriedale ewes were included in this study [HPA: 47.5 ± 1.3 kg, and 3.3 ± 0.1 body condition score (BCS; scale 1 = emaciated, 5 = obese; Jefferies, 1961); LPA: 46.3 ± 1.5 kg, and 3.2 ± 0.2 of BCS]. Shearing was performed during September (early spring in the southern hemisphere, non-breeding season). The animals were allocated in a 5 ha outdoor paddock with natural pasture and free access to water and natural shade provided by trees. Before shearing, the anoestrus condition of ewes was confirmed by scanning the ovaries and corroborating the absence of a corpus luteum by transrectal ultrasonography twice, separated by 9 days. The ewes were sheared (Day 0) in a roofed barn by four trained technicians using the Tally Hi method (performed with the animal untied). One ewe of each group was sheared simultaneously by two technicians, who sheared each ewe in 4 to 5 min. The

shearing of the first two ewes started at 08:00 h and the last two at 09:30 h. Immediately after shearing, ewes were allocated to two paddocks (300 m × 50 m) divided by electric fences, located into the paddock mentioned above, where they grazed natural grassland and had free access to water. The estimated forage allowance was 10 kg DM/100kg/day, and the predominant pasture species were *Stipa*, *Paspalum*, *Coelorachis*, *Piptochaetium*, *Oxalis*, *Cynodon*, *Cardus*, *Adesmia* genera. Whether the interval between behavioural recordings was greater than three consecutive days, ewes were allowed to graze on the entire 5 ha paddock to maintain the forage allowance.

5.4.4. Ambient recordings

During the experimental period, rainfall, ambient temperature, and relative humidity (RH) were obtained from the nearest Weather Station (located at 32°37' S and 54°19' W) of the Instituto Uruguayo de Meteorología (INUMET). Weather was recorded with an automatic equipment that recorded the ambient temperature under a meteorological shelter, 1.50 m from the ground. The ambient temperature ranged from 1 °C to 26.8 °C (mean ± SD: 18.3 ± 0.6 °C). The RH ranged from 32 % to 9 % (mean ± SD: 63.1 ± 2.9 %). During Days 21 and 22, 25 mm and 20 mm of rain fell, respectively. Rainfall was not observed on the other days.

5.4.5. Body weight and body condition

The ewes were weighed and the BCS was estimated on Days -4, 5, 15, 23, and 31 at mid-morning (10:00 – 11:00 h).

5.4.6. Behavioural recordings

The behaviour of the ewes was recorded on Days -3, -2, -1, 1, 2, 3, 4, 13, 14, 21, 22, 29 and 30. All the ewes were identified with large numbers painted on the flanks to facilitate individual identification from outside the paddocks. The observers were located at a minimum distance of 5 m to avoid disturbing the behaviour of the animals. Two trained observers recorded the following behaviours and postures of each ewe: standing up, lying down, walking, grazing and ruminating. Recordings were done using instantaneous visual sampling at 10 min intervals for 4 h in the morning (8:00 to 12:00 h) and 4 h in the afternoon (14:00 to 18:00 h), totalling 50 recordings/day. The observers were exchanged between groups in each interval.

5.4.7. Body surface temperature

Body surface temperature of the left cornea, left ear, nose and vulva were measured at mid-morning (09:00 to 10:00 h) on Days -4, 5, 15, 23 and 31, using an infrared camera [laser: Class 2, 0.05–40 m \pm 1% of the measured distance, infrared resolution photos: 464 \times 348 pixels, object range temperature: 20 to +120 °C, accuracy: \pm 0.3 °C, field of view: 24 \times 18 (18 mm lens), FLIR E95, Estonia]. Approximately 2 h before the recordings, ewes were moved to a roofed pen (8.0 m \times 15.0 m), located at 2.000 m from the outdoor paddock. The camera was calibrated to RH, ambient and reflective temperatures. The emissivity was set to 0.98, according to Labeur et al. (2017) and Menant et al. (2020). A single operator took all the images from a standard distance of 1.0 m from the ewe. After recording the surface temperatures, the rectal temperature was measured using a digital thermometer.

The pictures were analysed using the FLIR Tools software. Areas were delineated from the infrared images using a circle on different areas without wool. Regions of interest were defined close to the lacrimal caruncle (corneal temperature), on the central part of the vulva, on the left ear, and on the nose region (Fig. 1). As the rain interfered with the measurements, the pictures that were taken on Days 21 and 22 were not analysed. For each area, the minimum, mean and maximum temperatures were calculated with the aid of the software.

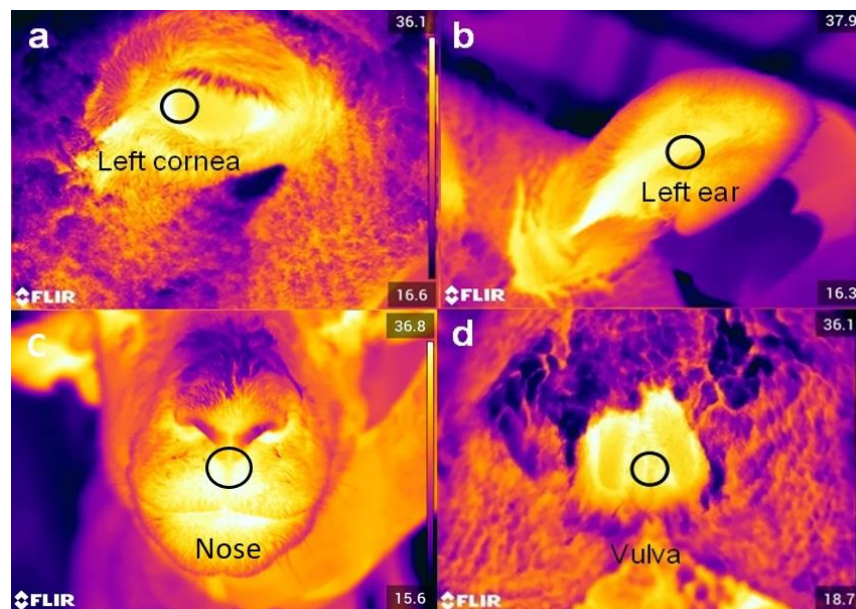


Fig. 1. Images of the infrared thermogram of the ewes analysed with the FLIR Tools software illustrating the regions considered: (a) left cornea, (b) left ear, (c) nose, and (d) vulva. The minimum (blue point), mean and maximum (yellow point) temperatures were estimated for each area.

5.4.8. Blood samples, and metabolites and hormonal determinations

After taking the pictures, blood samples were collected from ewes by jugular venipuncture using tubes without anticoagulant and tubes with iodoacetate

and heparin (Eurotubo, Deltalab, Rubi, Spain). Samples were centrifuged for 15 min at 3000 g, and the plasma or the serum were separated and frozen at -20 °C.

Serum total protein, albumin, and plasma glucose concentrations of all samples were measured with commercial kits (Bio-Systems, Barcelona, Spain) using an automatic equipment (Humastar 80, Human, Wiesbaden, Germany) at the Unidad de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay. Calibration controls were included for biochemical measurements. Insulin concentrations were measured using a radioimmunoassay kit (IRMA) (INS-IRMA; DIASource Immunoassays SA, Belgium) at the Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay. The assay sensitivity was 2.3 mUI/mL, and the intra-assay coefficients of variation were 7.3 % and 12.1 % for low and high controls, respectively. The glucose: insulin ratio was calculated.

5.4.9. Statistical analyses

The normal distribution of the data was confirmed using the Shapiro-Wilk test assuming that when $P > 0.05$ the data were normally distributed. The frequency of each behaviour was calculated and expressed as a percentage of observations/day. A mean value was calculated for the data recorded the three days before shearing, which is presented as BS (before shearing). All the data were compared between treatments with a mixed model (mixed proc of SAS; platform SAS OnDemand for Academic). The time was included as a repeated factor in the model, which included the treatments (HPA vs LPA), the time, and their interaction as fixed effects, and the ewe and the mother's block as random effects. When the estimate of the covariance parameter for the mother's block was zero or near zero, the block was removed from the model. Post-hoc comparisons were made using the pdiff option of SAS. To determine the acute

changes induced by shearing on behaviour, the same analysis was performed, including only Days -3 and 1. Data are presented as LSmeans \pm SEM, and were considered as significantly different when $P \leq 0.05$, and as tendencies when $0.05 < P \leq 0.1$.

5.5. RESULTS

5.5.1. Body weight and body condition

The nutritional treatment applied to the mothers did not affect the body weight or BCS of the ewes. The body weight varied with time ($P < 0.0001$; Fig. 2), decreasing from Day -4 to Day 5, ($P < 0.001$), and increasing from Day 5 to Day 23 ($P < 0.001$). There was no interaction between treatment and time.

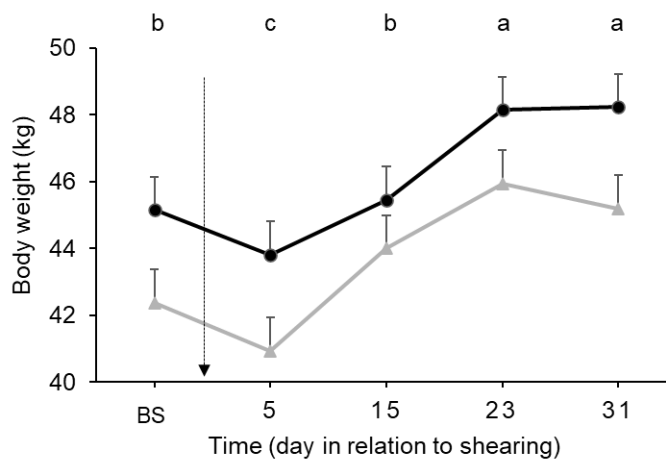


Fig. 2. Body weight of LPA ($-\Delta-$) and HPA ewes ($-\bullet-$) before and after spring shearing. Non-gestating six-year-old ewes born to mothers that grazed on high (HPA: 10-12 DM/100 kg BW/day) or low (LPA: 5-8 DM/100 kg BW/day) forage allowance of natural grassland from 23 days before conception until 122 days of gestation. Time is in relation to the day of shearing, which is indicated by the arrow. Different letters indicate significant differences between days ($P < 0.05$).

5.5.2. Behaviours

When all data were analysed, only a tendency was found in rumination: the HPA ewes tended to ruminate more frequently than the LPA ewes ($P = 0.07$; Table

1). No interaction between treatment and time was found in any studied variable. On the other hand, all recorded behaviours varied with time ($P < 0.0001$; Fig. 3a, 3b, 3c, 3d, 3e).

When only acute behavioural changes were analysed (Day -3 vs Day 1), there was a significant interaction between treatment and time in rumination frequency ($P = 0.02$). Shearing decreased rumination frequency in both groups ($P < 0.03$), but the reduction was greater in LPA ewes than in HPA ewes. Before shearing, the rumination frequency did not differ between groups (HPA: 21.2 ± 2.3 % vs LPA: 23.0 ± 2.4 %), but after shearing, the frequency of observations ruminating was greater in HPA than in LPA ewes (HPA: 17.2 ± 2.3 % vs LPA: 12.2 ± 2.4 %, $P = 0.01$). There was also the same type of interaction for standing behaviour ($P = 0.05$). Before shearing, LPA ewes were observed a lower proportion of times standing up than HPA ewes (71.2 ± 4.5 % vs 66.0 ± 4.7 %; $P < 0.0001$), but after shearing, LPA ewes were observed more times than HPA ewes (69.0 ± 4.7 % vs 65.9 ± 4.5 %; $P < 0.0001$). There were no acute changes on the other behaviours analysed after shearing.

Table 1. Standing up, lying down, grazing, ruminating and waking frequencies in LPA (–Δ–) and HPA ewes (—●—) before and after spring shearing. Non-gestating six-year-old ewes born to mothers that grazed on high (HPA: 10-12 DM/100 kg BW/day) or low (LPA: 5-8 DM/100 kg BW/day) forage allowance of natural grassland from 23 days before conception until 122 days of gestation.

	Least square means				P	
	HPA	LPA	SEM	Treat	Day	TreatxDay
Standing up (%)	75.1	74.6	0.8	0.73	<0.0001	0.62
Lying down (%)	16.7	16.4	0.8	0.84	<0.0001	0.92
Grazing (%)	72.7	72.1	0.8	0.6	<0.0001	0.83
Ruminating (%)	13.5	11.9	1.4	0.07	<0.0001	0.22
Walking (%)	7.9	8.6	0.3	0.24	<0.0001	0.83

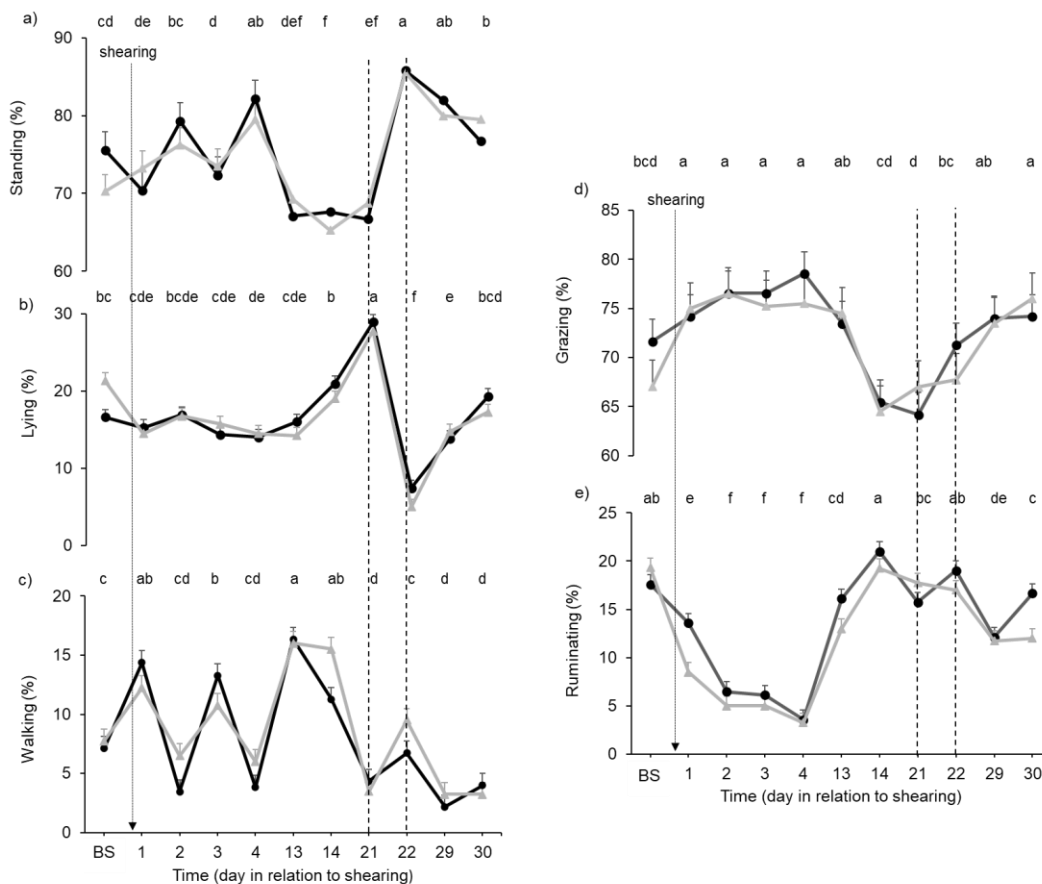


Fig. 3. Percentage of observations (a) standing up, (b) lying down, (c) walking, (d) grazing and (e) ruminating in LPA ($-\Delta-$) and HPA ewes ($-\bullet-$) before and after spring shearing. Non-gestating six-year-old ewes born to mothers that grazed on high (HPA: 10-12 DM/100 kg BW/day) or low (LPA: 5-8 DM/100 kg BW/day) forage allowance of natural grassland from 23 days before conception until 122 days of gestation. Time is in relation to the day of shearing, which is indicated by the arrow. The dotted lines indicate rainy days (25 mm and 20 mm, respectively). Different letters indicate significant differences between days ($P < 0.05$).

5.5.3. Body surface temperatures and rectal temperature

The treatment of the mothers did not affect the surface temperatures. The maximum temperature of the vulva ($P = 0.08$) and the average ear temperature ($P = 0.1$) tended to be greater in HPA than in LPA ewes (Table 2). All the surface temperatures measured varied with time ($P < 0.05$).

There were interactions between treatment and time in the maximum and minimum temperatures of the ear ($P = 0.05$ and $P = 0.03$, respectively). Both, maximum and minimum temperatures, were greater in HPA than in LPA ewes before shearing ($P = 0.003$, $P = 0.007$; respectively, Fig. 4a). Meanwhile, the maximum temperature of the ear decreased in HPA ewes ($P < 0.0001$) on Day 5 after shearing, no changes were observed in LPA ewes. On Day 15, the ear temperatures of ewes from both groups had increased. There was also an interaction between treatment and time in the maximum and minimum temperatures of the nose ($P = 0.04$ and $P = 0.02$, respectively). Before shearing, the maximum temperature was greater in HPA than LPA ewes, but LPA ewes had a greater minimum temperature than HPA ewes ($P = 0.02$ and $P = 0.003$, respectively, Fig. 4b). Additionally, there was an interaction between treatment and time in the maximum temperature of the vulva ($P = 0.03$): HPA ewes had a greater maximum temperature of the vulva on Day 15 after shearing than LPA ewes ($P = 0.003$, Fig. 4c).

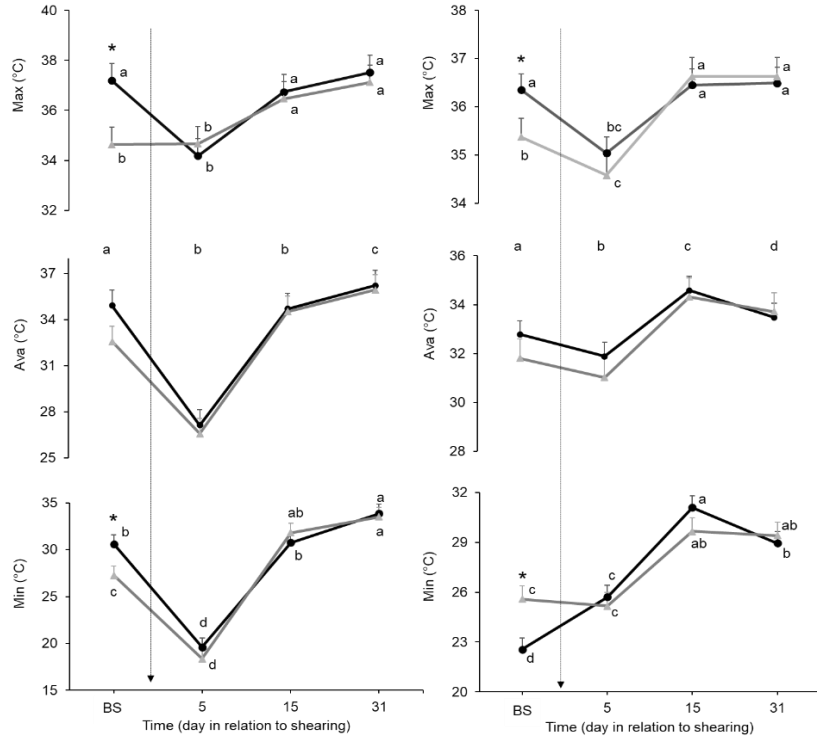
The corneal surface temperature was not affected by the nutritional treatment of the mothers or the interaction between treatment and time, but varied with time ($P < 0.001$). The maximum, minimum, and average temperature of the corneal surface temperature decreased from Day -4 to Day 5, ($P < 0.001$), and increased from Day 5 to Day 15 ($P < 0.001$).

Rectal temperature (RT) was not affected by the treatment, but varied with time ($P < 0.001$, Fig. 5). The RT decreased from Day -4 to Day 5 ($P < 0.001$), and increased from Day 5 to Day 15 ($P < 0.001$). There was no interaction between treatment and time.

Table 2. Maximum, minimum and average superficial temperature of the vulva, left eye, left ear and nose in LPA ($-\Delta-$) and HPA ewes ($-\bullet-$) before and after spring shearing. Non-gestating six-year-old ewes born to mothers that grazed on high (HPA: 10-12 DM/100 kg BW/day) or low (LPA: 5-8 DM/100 kg BW/day) forage allowance of natural grassland from 23 days before conception until 122 days of gestation.

	Least square means					P
	HPA	LPA	SEM	Treat	Day	Treat \times Day
Vulva ($^{\circ}$ C)						
Maximum	36.9	36.2	0.3	0.08	0.31	0.03
Minimum	31.6	31.3	0.3	0.69	0.06	0.34
Average	34.9	34.6	0.2	0.25	0.0002	0.15
Left eye ($^{\circ}$ C)						
Maximum	37.1	37	0.1	0.58	<0.0001	0.48
Minimum	34	33.9	0.2	0.8	0.005	0.41
Average	33.2	32.4	0.3	0.2	<0.0001	0.33
Left ear ($^{\circ}$ C)						
Maximum	36.4	35.7	0.3	0.15	<0.0001	0.05
Minimum	28.7	27.7	0.5	0.21	<0.0001	0.03
Average	33.2	32.4	0.3	0.1	<0.0001	0.34
Nose ($^{\circ}$ C)						
Maximum	36.1	35.8	0.2	0.35	<0.0001	0.04
Minimum	27.1	27.5	0.3	0.45	<0.0001	0.02
Average	33.2	32.7	0.3	0.23	<0.0001	0.29

Minimum environmental temperature (°C)	7.0	7.6	8.0	11.6	7.0	7.6	8.0	11.6
Mean environmental temperature (°C)	10.0	14.0	15.0	15.0	10.0	14.0	15.0	15.0



Minimum environmental temperature (°C)	7.0	7.6	8.0	11.6	7.0	7.6	8.0	11.6
Mean environmental temperature (°C)	10.0	14.0	15.0	15.0	10.0	14.0	15.0	15.0

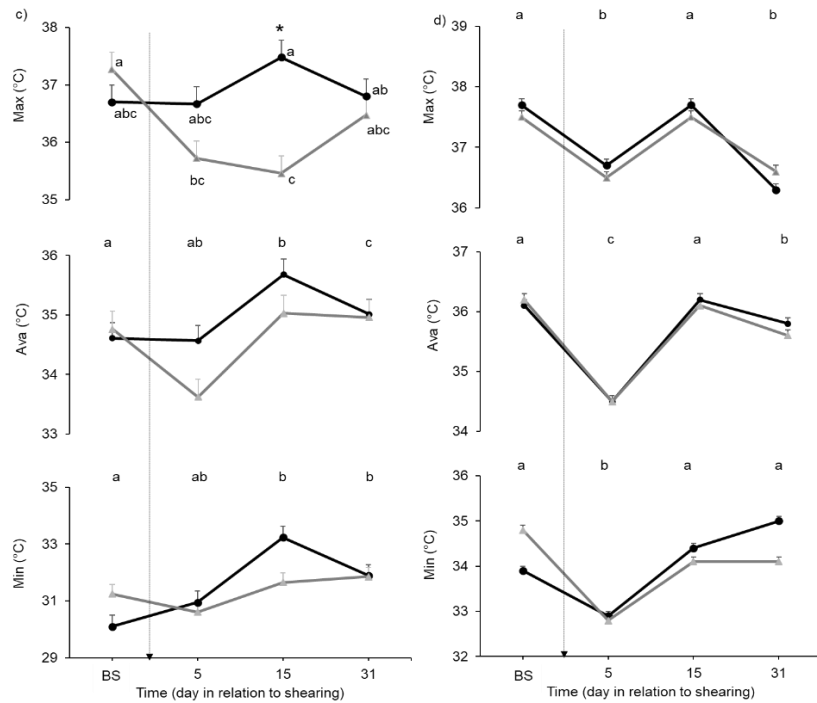


Fig. 4. Maximum (Max °C), minimum (Min °C), and average (Ave °C) surface temperature of the (a) ear, (b) nose, (c) vulva, and (d) cornea of LPA (—Δ—) and HPA ewes (—●—) before and after spring shearing. Non-gestating six-year-old ewes born to mothers that grazed on high (HPA: 10-12 DM/100 kg BW/day) or low (LPA: 5-8 DM/100 kg BW/day) forage allowance of natural grassland from 23 days before conception until 122 days of gestation. The gray text box shows the minimum and average ambient temperatures during the surface temperature measurement. Time is in relation to the day of shearing, which is indicated by the arrow. The asterisk indicates that there were differences between groups on that day. Different letters indicate significant differences between days ($P < 0.05$)

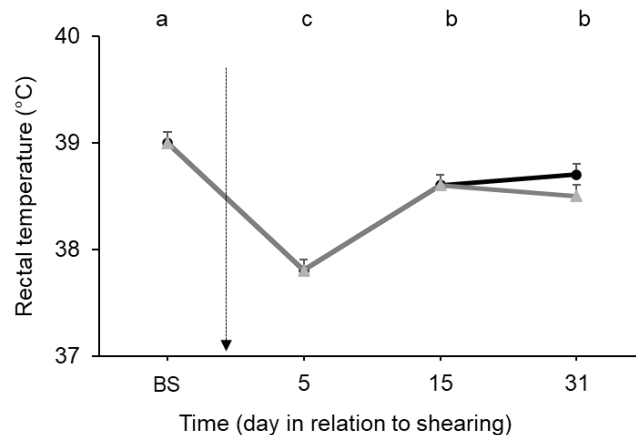


Fig. 5. Rectal temperature of LPA (—Δ—) and HPA ewes (—●—) before and after spring shearing. Non-gestating six-year-old ewes born to mothers that grazed on high (HPA: 10-12 DM/100 kg BW/day) or low (LPA: 5-8 DM/100 kg BW/day) forage allowance of natural grassland from 23 days before conception until 122 days of gestation. Time is in relation to the day of shearing, which is indicated by the arrow. Different letters indicate significant differences between days ($P < 0.05$).

5.5.4. Metabolites and hormonal determinations

Insulin concentration tended to be greater in LPA than in HPA ewes ($P = 0.06$, Table 3). It also changed with time ($P = 0.05$): from Day 5 until Day 15 the insulin concentration decreased ($P = 0.02$; Fig. 6). There was no interaction between treatment and time in insulin concentration.

Albumin, total proteins, and glucose concentrations were not affected by the treatment (Table 3), but varied with time ($P < 0.01$). The albumin and total protein concentrations decreased from Day 5 until Day 15 ($P < 0.0001$). The glucose concentration decreased from Day 15 until Day 23 ($P = 0.01$). There was no interaction between treatment and time in any blood metabolites. The glucose:insulin ratio was not affected by any studied factor.

Table 3. Concentration of glucose, insulin, albumin and total protein, and glucose:insulin ratio in LPA ($-\Delta-$) and HPA ewes ($-\bullet-$) before and after spring shearing. Non-gestating six-year-old ewes born to mothers that grazed on high (HPA: 10-12 DM/100 kg BW/day) or low (LPA: 5-8 DM/100 kg BW/day) forage allowance of natural grassland from 23 days before conception until 122 days of gestation.

	Least square means			P		
	HPA	LPA	SEM	Treat	Day	TreatxDay
Glucose (g/L)	0.68	0.68	0.01	0.95	0.0009	0.93
Insulin (μ IU/mL)	10.85	8.88	0.36	0.06	0.05	0.49
Albumin (g/dL)	2.83	2.81	0.04	0.78	0.0003	0.36
Total protein (g/dL)	6.07	6.59	0.1	0.55	0.0006	0.61
Glucose:insulin ratio	0.08	0.07	0.004	0.63	0.69	0.53

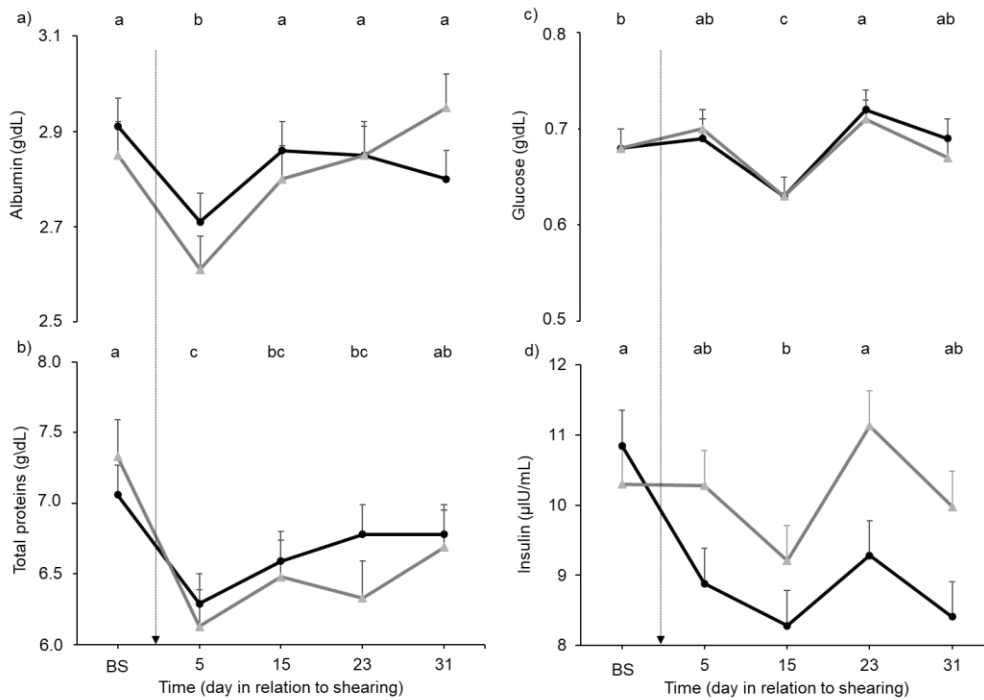


Fig. 6. (a) Albumin, (b) total proteins, (c) glucose and (d) insulin blood concentrations of LPA ($-\Delta-$) or HPA ewes ($-\bullet-$) before and after spring shearing. Non-gestating six-year-old ewes born to mothers that grazed on high (HPA: 10-12 DM/100 kg BW/day) or low (LPA: 5-8 DM/100 kg BW/day) forage allowance of natural grassland from 23 days before conception until 122 days of gestation. Time is in relation to the day of shearing, which is indicated by the arrow. Different letters indicate significant differences between days ($P < 0.05$).

5.6. DISCUSSION

Undernutrition of pregnant ewes affected the thermoregulatory and the acute behavioural responses of their aged female offspring to spring shearing. The application of nutritional treatments to experimental ewes during their intrauterine development also tended to have long-term effects on insulin concentration. Our results reaffirm previous data collected on the same ewes, reporting that maternal subnutrition determines changes in the distribution of blood perfusion according to the body region (Zócalo et al., 2019), demonstrating that some effects remain until adulthood. Although both groups of ewes received the same handlings and remained together throughout their extrauterine life, the earlier treatment still had consequences on their physiological functioning and behaviour.

After shearing, LPA ewes reduced the maximum surface temperature of the vulva, whilst HPA ewes did not. It is possible that LPA ewes responded with a higher level of vasoconstriction than HPA ewes to prevent heat loss to the environment and the reduction of body temperature as they may, perhaps, have had a lower metabolic rate (Donovan et al., 2013). After shearing, the difference in surface temperatures between treatments was observed only in the vulva, a region with a high density of blood vessels near the dermal surface (Bassett, 1965). The body's anatomic regions with a higher level of irrigation are those more susceptible to changes in ambient temperature, responding rapidly with vasoconstriction or vasodilatation (Mota-Rojas et al., 2021).

It is important to point out that as ewes were in anoestrus, there were no changes in vulva surface temperature related to the phase of the oestrous cycle (Barros de Freitas et al., 2018). Immediately before taking the thermographic images, the ewes were exposed to minimum temperatures of up to 7.2 °C, cooling

winds often being an attributing factor in the region (Barreiro et al., 2021). A behavioural strategy used by small ruminants in this situation is to locate themselves rostrally and parallel to the wind (Rodríguez and Águeda, 2018). This positioning most likely protected the vulva from heat loss, nevertheless heat loss increased by convection in the ear and nose areas. As ear and nose areas were more susceptible to heat exchanges before shearing, differences between groups were observed in the maximum and average temperatures of the ear and nose, but not of the vulva. It has been reported that maternal undernourishment impairs thermoregulation in neonatal humans (Longo et al., 2013; Salam et al., 2014), rats (Luz et al., 2003; Tonkiss et al., 2003), goats, sheep (Mahboub et al., 2013) and guinea pigs (Tolco et al., 2002). Therefore, this study provides new information on long-term effects of maternal nutritional restriction on homeothermic thermoregulation in farm ruminants. On the other hand, although there were differences between groups in the mechanisms used to reduce heat loss, none affected rectal temperature. These results indicate that a period of undernourishment during fetal development still affects the strategy used to maintain the core temperature in adulthood. As previously reported, the blood distribution differed when the ewes used in the present study, were 2.5 y-old (Zócalo et al., 2019). As a consequence, differences in blood flow pattern between groups is possibly a factor influencing thermolysis. There were no differences noted in rectal temperature between groups, however they did differ in thermolysis, so thermogenic mechanisms might also differ. In this sense, both groups of ewes appear to present metabolic differences, as LPA ewes tended to have a greater insulin concentration than HPA ewes. Moreover, preliminary blood metabolomics results of the ewes used in this work suggest that the energy metabolism and the control of food intake of LPA ewes were increased (Jorge-Smeding et al., 2021).

One day after shearing, probably LPA ewes were more stressed than HPA ewes as they displayed a lower rumination frequency and a greater standing up frequency. After weaning, a stressful situation, ewes increase their alert and standing up frequencies and decrease their time ruminating (Freitas-de-Melo et al., 2022), the latter of which is used as a reliable indicator of stress response (Negrao et al., 2010). Total protein and albumin concentrations decreased in both groups after shearing, which might indicate a stressful situation for the ewes (Ungerfeld y Freitas-de-Melo, 2019; Arfuso et al., 2022). This decrease in blood protein after shearing may also indicate the activation of proteolysis pathways to maintain whole-body energy homeostasis. On the other hand, both groups of ewes increased grazing frequency in the first 4 days after shearing, likely to increase metabolic rate to maintain homeothermy. This response appears effective as 15 days after shearing, both groups of ewes gain body weight. Furthermore, during this study, it rained on the 21st and 22nd days, which likely triggered changes in the ewes' behavioural patterns. Differing from recordings of the previous periods, ewes increased the time lying down and ruminating, and decreased the time standing up and grazing. These results are in agreement with Arnold (1982) and Champion et al. (1994), who both reported that grazing ewes reduce the time spent grazing and eating during rainy days.

In conclusion, undernutrition of pregnant ewes modified the thermoregulatory mechanisms of the aged female offspring after shearing, the surface temperature being noticeably affected. The acute behavioural changes after shearing (greater standing up and lower ruminating frequencies), indicated that shearing affected more LPA than HPA ewes. The nutritional treatment applied to the mothers during gestation slightly influenced the insulin concentration of female offspring at six years old. These results reinforce the concept that underfeeding during gestation has a long-term effect on ewes' physiological functioning and behaviours. The long-term effects of maternal

subnutrition noticed in this study highlight the importance of providing proper nutrition to pregnant ewes.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge Victoria Añon, Belen Lopez-Perez, Fernanda Montana, Arantxa Barreneche, Gabriela Balero, Carolina Vargas and Isabel Arburuas for their help with data collection. Nicolas Zunino and Ignacio Sosa for their help with animal management. Authors are also grateful to Vinicius de Franca Carvalho Fonseca for the insightful comments on our manuscript, and to Instituto Uruguayo de Meteorología (INUMET) for providing the meteorological data.

5.7. REFERENCES

- Abud, M. J., Bielli, A., Ithurralde, J., Freitas-de-Melo, A., Álvarez-Oxiley, A., López-Pérez, Á., Ungerfeld, R., Pérez-Clariget, R. (2020). Forage allowances offered to pregnant ewes until middle and late gestation: Organ priorities on foetus development. *South African Journal of Animal Science*, 50(3), 471–480. [10.4314/sajas.v50i3.14](https://doi.org/10.4314/sajas.v50i3.14)
- Arfuso, F., Fazio, F., Chikhi, L., Aymond, G., Piccione, G., y Giannetto, C. (2022). Acute stress response of sheep to shearing procedures: dynamic change of cortisol concentration and protein electrophoretic pattern. *Animals*, 12(7), 862. <https://doi.org/10.3390/ani12070862>
- Arnold, G. W. (1982). Some factors affecting the grazing behaviour of sheep in winter in New South Wales. *Applied Animal Ethology*, 8(1-2), 119–125. [https://doi.org/10.1016/0304-3762\(82\)90137-7](https://doi.org/10.1016/0304-3762(82)90137-7)
- Barreiro, M., Arizmendi, F., Diaz, N., Trinchin, R. (2021). Análisis de viabilidad y tendencias observadas de los vientos en Uruguay. CONVENIO PNUD-UDELAR Proyecto URU/18/002 “Integración del enfoque de adaptación en ciudades, infraestructura y ordenamiento territorial en Uruguay”. [FCIEN Análisis de la variabilidad y tendencias observadas de los vientos en Uruguay c.pdf \(www.gub.uy\)](https://www.fcienc.gov.uy/FCIEN_Análisis_de_la_variabilidad_y_tendencias_observadas_de_los_vientos_en_Uruguay_c.pdf)
- Barros de Freitas, A. C., Ortiz Vega, W. H., Quirino, C. R., Bartholazzi Junior, A., Gomes David, C. M., Geraldo, A. T., Silva Rua, M. A., Cipagauta Rojas, L. F., Eustáquio de Almeida Filho, J., Burla Dias, A. J. (2018). Surface temperature of ewes during estrous cycle measured by infrared thermography. *Theriogenology*, 119, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.07.015>
- Bassett, EG. (1965). The anatomy of the pelvic and perineal regions of the ewe. *Australian Journal of Zoology*, 13(2), 201. <https://doi.org/10.1071/ZO9650201>

- Bloomfield, F. H., Oliver, M. H., Giannoulas, C. D., Gluckman, P. D., Harding, J. E., y Challis, J. R. G. (2003). Brief undernutrition in late-gestation sheep programs the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adult offspring. *Endocrinology*, 144(7), 2933–2940. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0189>
- Budge, H., Bispham, J., Dandrea, J., Evans, E., Heasman, L., Ingleton, P. M., Sullivan, C., Wilson, V., Stephenson, T., Symonds, M. E. (2000). Effect of maternal nutrition on brown adipose tissue and its prolactin receptor status in the fetal lamb. *Pediatric Research*, 47(6), 781–786. <https://doi.org/10.1203/00006450-200006000-00017>
- Carcangiu, V., Arfuso, F., Luridiana, S., Giannetto, C., Rizzo, M., Bini, P. P., y Piccione, G. (2018). Relationship between different livestock managements and stress response in dairy ewes. *Archives Animal Breeding*, 61(1), 37-41.
- Champion, R. A., Rutter, S. M., Penning, P. D., y Rook, A. J. (1994). Temporal variation in grazing behaviour of sheep and the reliability of sampling periods. *Applied Animal Behaviour Science*, 42(2), 99–108. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(94\)90150-3](https://doi.org/10.1016/0168-1591(94)90150-3)
- Dwyer, C. M., Lawrence, A. B., Bishop, S. C., y Lewis, M. (2003). Ewe–lamb bonding behaviours at birth are affected by maternal undernutrition in pregnancy. *British Journal of Nutrition*, 89(01), 123. <https://doi.org/10.1079/BJN2002743>
- Donovan, E. L., Hernandez, C. E., Matthews, L. R., Oliver, M. H., Jaquierey, A. L., Bloomfield, F. H., y Harding, J. E. (2013). Periconceptional undernutrition in sheep leads to decreased locomotor activity in a natural environment. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 4(04), 296–299. <https://doi.org/10.1017/S2040174413000214>
- Fazio, F., Arfuso, F., Rizzo, M., Giannetto, C., Giudice, E., Zanghì, E., y Piccione, G. (2018). Livestock handling and road transport influence some oxidative stress parameters in ewes. *Journal of Veterinary Behaviour*, 26, 5-10.

- Ford, S. P., Hess, B. W., Schwoppe, M. M., Nijland, M. J., Gilbert, J. S., Vonnahme, K. A., Means, W. J., Han, H., Nathanielsz, P. W. (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. <https://doi.org/10.2527/jas.2005-624>
- Freitas-de-Melo, A., Orihuela, A., Hötzel, M. J., y Ungerfeld, R. (2022). What do we know and need to know about weaning in sheep? An overview of weaning practises, stress and welfare. *Frontiers in Animal Science*, 3, 823188. <https://doi.org/10.3389/fanim.2022.823188>
- Freitas-de-Melo, A., Terrazas, A., Ungerfeld, R., Hötzel, M. J., Orihuela, A., y 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. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.10.016>
- Freitas-de-Melo, A., Ungerfeld, R., Orihuela, A., Hötzel, M. J., y Pérez-Clariget, R. (2017). Early mother–young relationship and feeding behaviour of lambs are unaffected by low pasture allowance until the beginning of the last third of gestation in single-bearing ewes. *Animal Production Science*, 58(5), 930. <https://doi.org/10.1071/AN16157>
- 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. *Applied Animal Behaviour Science*, 168, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.04.009>
- Gardner, D. S., Tingey, K., Van Bon, B. W. M., Ozanne, S. E., Wilson, V., Dandrea, J., Keisler, D. H., Stephenson, T., Symonds, M. E. (2005). Programming of glucose-insulin metabolism in adult sheep after maternal undernutrition. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and*

Comparative Physiology, 289(4), R947–R954.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00120.2005>

George, L. A., Zhang, L., Tuersunjiang, N., Ma, Y., Long, N. M., Uthlaut, A. B., ... Ford, S. P. (2012). Early maternal undernutrition programs increased feed intake, altered glucose metabolism and insulin secretion, and liver function in aged female offspring. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 302(7), R795–R804.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00241.2011>

Giannetto, C., Arfuso, F., Fazio, F., Giudice, E., Panzera, M., yPiccione, G. (2017). Rhythmic function of body temperature, breathing and heart rates in newborn goats and sheep during the first hours of life. *Journal of Veterinary Behaviour*, 18, 29-36.

Inumet (2020). Climatología de la primavera (set-oct-nov) en Uruguay 1981 - 2010. <https://www.inumet.gub.uy/sites/default/files/2020-05/CLIMATOLOGIA%20DE%20LA%20PRIMAVERA.pdf>

Jefferies BC (1961) Body condition scoring and its use in management. *TasmanianJournalofAgriculture* 32: 19-21.

Jorge-Smeding, Ezequiel, Corrales M. F., López-Pérez M. B y Pérez-Clariget, Raquel. (2021). Programación fetal del metabolismo: cambios en el metaboloma plasmático de ovejas adultas. 44° Congreso de la Asociación Argentina de Producción Animal. Modalidad Virtual. 17-19 noviembre 2021.

Labeur, L., Villiers, G., Small, A. H., Hinch, G. N., ySchmoelzl, S. (2017). Infrared thermal imaging as a method to evaluate heat loss in newborn lambs. *Research in Veterinary Science*, 115, 517–522.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.09.023>

Longo, S., Bollani, L., Decembrino, L., Di Comite, A., Angelini, M., yStronati, M. (2012). Short-term and long-term sequelae in intrauterine growth

- retardation (IUGR). *The Journal of Maternal-Fetal Neonatal Medicine*, 26(3), 222–225. <https://doi.org/10.3109/14767058.2012.715006>
- Luz, J., Griggio, M. A., y Vieira, L. V. (2003). Impact of maternal food restriction on cold-Induced thermogenesis in the offspring. *Neonatology*, 84(3), 252–258. <https://doi.org/10.1159/000072309>
- Mahboub, H. D., Ramadan, S. G., Helal, M. A., yAziz, E. A. (2013). Effect of maternal feeding in late pregnancy on behaviour and performance of Egyptian goat and sheep and their offspring. *Global Veterinaria*, 11(2), 168-176. [10.5829/idosi.gv.2013.11.2.74152](https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2013.11.2.74152)
- Menant, O., Ungerfeld, R., Pérez-Clariget, R., y Freitas-de-Melo, A. (2020). Is body surface temperature measured on the single lambs' back a reliable indicator of the Ewe-lamb bond around birth? *Journal of Thermal Biology*, 102699. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102699>
- Mota-Rojas, D., Pereira, A. M. F., Wang, D., Martínez-Burnes, J., Ghezzi, M., Hernández-Avalos, I., Lendez, P., Mora-Medina, P., Casas, A., Olmos-Hernández, A., Domínguez, A., Bertoni, A., Geraldo, A. de M. (2021). Clinical applications and factors involved in validating thermal windows used in infrared thermography in cattle and river buffalo to assess health and productivity. *Animals*, 11(8), 2247. <https://doi.org/10.3390/ani11082247>
- Nathanielsz, P. W., y Hanson, M. A. (2003). The fetal dilemma: spare the brain and spoil the liver. *The Journal of Physiology*, 548(Pt 2), 333. [10.1113/jphysiol.2003.040527](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.040527)
- Negrao, J. A., Porcionato, M. A. de F., de Passille, A. M., y Rushen, J. (2010). Behavioural responses of heifers to ACTH injections. *Applied Animal Behaviour Science*, 128(1-4), 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2010.09.008>

- Nicol, A. M., y Brookes, I. M. (2007). The metabolisable energy requirements of grazing livestock. *Pasture and supplements for grazing animals*, 14, 151-172.
- Nielsen, M. O., Kongsted, A. H., Thygesen, M. P., Strathe, A. B., Caddy, S., Quistorff, B., Jørgensen, W., Christensen, V. G., Husted, S., Chwalibog, A., Sejrsen, K., Purup, S., Svalastoga, E., McEvoy, F. J., Johnsen, L. (2012). Late gestation undernutrition can predispose for visceral adiposity by altering fat distribution patterns and increasing the preference for a high-fat diet in early postnatal life. *British Journal of Nutrition*, 109(11), 2098–2110. <https://doi.org/10.1017/S0007114512004199>
- Oliver, M. H., Breier, B. H., Gluckman, P. D., y Harding, J. E. (2002). Birth weight rather than maternal nutrition influences glucose tolerance, blood pressure, and IGF-I levels in sheep. *PediatricResearch*, 52(4), 516–524. [10.1203/00006450-200210000-00010](https://doi.org/10.1203/00006450-200210000-00010)
- Pérez-Clariget, R., Corrales, M. F., López-Pérez, M. B y Jorge-Smeding, E. (2021). Ovejas adultas nacidas de madres restringidas durante la gestación prefieren alimento gluconeogénico y muestran un comportamiento ingestivo más activo. 7° Congreso de la Asociación Uruguaya de Producción Animal - AUPA 2021. Modalidad virtual, 14 y 15 diciembre 2021.
- Revella, D. K., Main, S. F., Breier, B. H., Cottam, Y. H., Hennies, M., y McCutcheon, S. N. (2000). Metabolic responses to mid-pregnancy shearing that are associated with a selective increase in the birth weight of twin lambs. *Domestic Animal Endocrinology*, 18(4), 409-422. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(00\)00059-X](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(00)00059-X)
- Rodríguez, M. G., y de Miguel Águeda, F. J. (2018). Body orientation of sheep in herds. *Small Ruminant Research*, 166, 83-86. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.09.017>

- Salam, R. A., Das, J. K., yBhutta, Z. A. (2014). Impact of intrauterine growth restriction on long-term health. *Current Opinion in Clinical Nutrition y Metabolic Care*, 17(3), 249-254. [10.1097/MCO.0000000000000051](https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000051)
- Symonds, M, Bryant, M, y Lomax, M. (1988a). Metabolic adaptation during pregnancy in winter-shorn sheep. *The Journal of Agricultural Science*, 111(01), 137. <https://doi.org/10.1017/S0021859600082939>
- Symonds M, Bryant M, Shepherd D, Lomax M, (1988b). Glucose metabolism in shorn and unshorn pregnant sheep. *British Journal of Nutrition* 60, 249-263. <https://doi.org/10.1079/BJN19880097>
- Tolcos, M., Rees, S., McGregor, H., y Walker, D. (2002). Consequences of intrauterine growth restriction on ventilatory and thermoregulatory responses to asphyxia and hypercapnia in the newborn guinea-pig. *Reproduction, Fertility and Development*, 14(2), 85-92. <https://doi.org/10.1071/RD01062>
- Tonkiss, J., Bonnie, K. E., Hudson, J. L., Shultz, P. L., Duran, P., y Galler, J. R. (2003). Ultrasonic call characteristics of rat pups are altered following prenatal malnutrition. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, 43(2), 90-101. <https://doi.org/10.1002/dev.10124>
- Ungerfeld, R., y Freitas-de-Melo, A. (2019). Stress and behavioural responses to winter shearing differ between pregnant and non-pregnant ewes. *Physiology yBehaviour*, 210, 112653. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112653>
- Ungerfeld, R., Freitas-de-Melo, A., Damián, J. P., Fernández-Werner, A., y Kremer, R. (2018). Behavioural and physiological changes in pregnant ewes after winter shearing. *Small Ruminant Research*, 169, 57-61. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.10.017>
- Zócalo, Y., Ungerfeld, R., Pérez-Clariget, R., y Bia, D. (2020). Maternal nutritional restriction during gestation impacts differently on offspring muscular and

elastic arteries and is associated with increased carotid resistance and ventricular afterload in maturity. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 11(1), 7-17. <https://doi.org/10.1017/S2040174419000230>

6. STRESS RESPONSE TO SOCIAL ISOLATION FOLLOWED BY EXPOSURE TO A NOVEL OBJECT OF AGED EWES BORN TO UNDERNOURISHED MOTHERS

Florencia Corrales Hlinka¹; Raquel Pérez-Clariget¹; Rodolfo Ungerfeld²; Aline Freitas-de-Melo²

¹Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay,

²Departamento de Biociencias Veterinarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay.

6.1. RESUMEN

La subnutrición materna afecta el comportamiento, el metabolismo y la sensibilidad a estresores de la descendencia. El aislamiento es un estresor que genera cambios comportamentales y fisiológicos en ovinos, por lo que es una forma estandarizada para vincular los efectos de la subnutrición materna durante la gestación con la respuesta de estrés en ovejas adultas. El objetivo de este trabajo fue comparar la respuesta comportamental y fisiológica a una prueba de aislamiento social y presentación de objeto novedoso en ovejas adultas nacidas de madres que sufrieron una restricción nutricional durante la gestación con las que no fueron restringidas. Se utilizaron 20 ovejas Corriedale en anestro, nacidas de partos simples. Las madres de estas ovejas pastorearon en campo natural desde 23 días antes de la concepción hasta 122 de la gestación con dos ofertas de forraje: 1) alta (grupo AOF; 10-12 kg MS/100 kg dePV/día; n=11], o 2) baja (grupo BOF; 5-8 kg MS/100 kg PV/día; n=9). A los 6 años de edad (marzo de 2020) se realizó una prueba de aislamiento y presentación de objeto novedoso. Las ovejas se colocaron individualmente dentro de un corral (4m x 4m) con el piso pintado con 16 cuadrantes, donde quedaron aisladas de otros animales por

10 min. A los 5 min de iniciada la prueba se dejó caer una pelota naranja (objeto novedoso) al interior de la jaula, siempre desde la misma posición y a la misma altura. Se registró el comportamiento de las ovejas durante la prueba a través de cámaras de video. Antes y después del TAS, se registraron las frecuencias cardíaca y respiratoria, las temperaturas rectal y superficial de ojo y oreja izquierda, hocico y vulva, y se extrajo sangre para determinación de albúmina, proteínas totales, glucosa y cortisol. El número de veces que se miró la pelota tendió a ser mayor en las ovejas AOF que en las BOF ($P = 0,08$). Las ovejas BOF tuvieron una mayor concentración de albúmina sérica que las ovejas AOF ($P = 0,02$). Los tratamientos nutricionales aplicados a las ovejas durante su desarrollo intrauterino no modificaron las respuestas de estrés al aislamiento social seguido de la exposición a un objeto novedoso. Sin embargo, la subnutrición materna durante la gestación aumentó la concentración de albúmina en la dependencia adulta.

6.2. ABSTRACT

Fetal programming by subnutrition affects offspring's behaviour, metabolism, and sensitivity to stressors in sheep. The objective was to determine the stress response of ewes born to mothers nutritionally restricted during gestation to social isolation followed by exposure to a novel object. Twenty-six-year-old Corriedale ewes born to mothers who grazed high or low pasture allowances (HPA and LPA groups) from 23 days before conception until 122 days of gestation were used. Ewes were individually isolated in a novel place for 10 min, and 5 min after its beginning, an orange ball was dropped into the test pen. The ewes' behaviours were recorded during the test. Blood proteins, glucose and cortisol concentrations, heart and respiratory rates and rectal and surface temperatures were determined. The number of times looking at the ball tended to be greater in HPA ewes than LPA ($P = 0.08$). The LPA ewes had greater serum albumin concentration than HPA ewes ($P = 0.02$). The nutritional treatments applied to ewes during their intrauterine development did not modify the stress responses to social isolation followed by exposure to a novel object. However, maternal undernourishment during gestation increased albumin concentration in their adult progeny.

Keywords: cortisol; metabolites; open field test; sheep; surface temperature; welfare.

6.3. INTRODUCTION

Sheep production is based on extensive grazing systems in most countries that export sheep products, such as Uruguay, where flocks mainly graze natural grassland (Morris 2017). In these systems, natural pasture, which is the main food source, follows a seasonal growth pattern, with the lowest forage availability in winter and the greatest in spring (Carámbula, 1991). In sheep breeds from temperate regions, the breeding season is in autumn, and gestation takes place in winter (Rodríguez-Iglesias et al., 1993). Therefore, pregnant ewes frequently suffer from undernourishment, which negatively influences the fetus's development, reducing the newborn's weight (Ithurrealde et al., 2020; Abud et al., 2020) and impacting the lamb's behaviour (Freitas-de-Melo et al., 2015). Undernourishment during fetal life also leads to physiological and behavioural changes in sheep later in life (Calkins and Devaskar, 2011), a phenomenon known as fetal programming. For instance, subnutrition of pregnant ewes decreases the locomotor activity of adult offspring (Donovan et al., 2013) and modifies both the cardiovascular (Zócalo et al., 2020) and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis functions (Hawkins et al., 1999; Chadio et al., 2007). The liver functionality is affected in full-term fetuses gestated to undernourished ewes, including the serum total protein, albumin and globulin concentrations in growing lambs (Gao et al., 2014). Two-month-old lambs born to undernourished ewes secrete greater ACTH and cortisol after a CRH challenge (Chadio et al., 2007). All this should be considered in farmed sheep since these are frequently subjected to different stress management practices, such as castration, tail docking, artificial weaning, shearing, social isolation, and transport (Hargreaves y Hutson, 1990; Grandin y Shivley, 2015). Therefore, studying the possible effects of fetal programming by subnutrition on the stress response of sheep reared in extensive production systems is essential for developing effective strategies to improve animal welfare.

The social isolation and the novel object test are standardised approaches to evaluate stress and fear in sheep (Forkman et al., 2007). As sheep are gregarious species, social isolation triggers behavioural and physiological indicators of stress, including an increase in locomotion, the number of vocalisations, heart and respiratory rates, and rectal and surface temperatures (Freitas-de-Melo et al., 2016; 2022a). Social stress in sheep also increases ACTH and cortisol secretion and modifies blood protein concentrations (Moberg, 1987; Parrott et al., 1988; Freitas-de-Melo et al., 2016). The novel object test involves exposing the animals to an unknown object following the social isolation test (Forkman et al., 2007). The animals' reactions to the novel object can be evaluated by recording both the latency and duration to contact the object and the distance that the animal stays from it (Forkman et al., 2007). These test can be valuable tools to determine the possible effects of fetal programming on the stress and fear responses of lambs. For example, lambs born to undernourished mothers during gestation spend less time walking than control lambs during social isolation, without different responses to the novel object test (Abecia et al., 2014). Lambs born to undernourished mothers walked more, had greater latencies to approach the object when exposed to the novelty and surprising test, and were more likely to jump (Erhard et al., 2004). However, other authors did not find the effects of being born to undernourished mothers on the behaviour of lambs during the social isolation test conducted at 2, 3, 4 and 5 months of age (Simitzis et al., 2009). In sheep of 18 months of age, Erhard et al. (2004) reported that animals born to nutritionally restricted mothers were more active during restraint and approached a novel stimulus more slowly. The studies mentioned above were conducted using pregnant ewes kept indoors as the experimental model, and the effects of subnutrition were studied on prepuberal offspring. However, to the best of our knowledge, there are no published studies on the impact of undernourishment during the gestation of ewes reared in extensive grazing systems on the adult offspring's reaction to stressors, a model that may be directly related to on-farm

easy handling and welfare applications. We hypothesised that nutrient restriction during foetal development affects the physiological and behavioural responses to social isolation followed by exposure to a novel object in aged female offspring. The aim of the study was to compare those responses in aged ewes born to mothers who grazed restricted pasture allowances during gestation to social isolation followed by exposure to a novel object.

6.4. MATERIALS AND METHODS

6.4.1. Location

All the experimental procedures were approved by the Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Exp. N.º020300-000714-20). The study was conducted at the Estación Experimental Bernardo Rosengurtt, Facultad de Agronomía, Udelar (32 ° S, 54 ° W).

6.4.2. Nutritional treatments applied to the ewe's mothers

The nutritional treatments applied to the mothers of the ewes used in the present work are described in detail by Freitas-de-Melo et al. (2015) and Abud et al. (2020). Briefly, multiparous Corriedale were used in a complete randomized block design and assigned to two treatments from 23 days before conception to 122 days of gestation. Only ewes bearing a single fetus remained in the experiment. While HPA ewes were born to ewes that grazed on natural grassland at 10-12 kg of dry matter (DM)/100 kg of body weight (BW)/day, LPA ewes were born to ewes that grazed at 5-8 kg of DM/100 kg of BW/day. Ewes remained continuously grazing on natural grassland without access to other food resources until day 116 of gestation, from then both groups of pregnant ewes received 200 g/animal/day

of rice bran (88% DM, 14% PC, 9% ADF, 24% NDF) and 50 mL of glycerin ewe/day (77% glycerol). On day 122 of gestation, all females were shorn and the nutritional treatments were finalized. From then to lambing, all ewes foraged as a single group on *Festuca arundinacea* (14 kg DM/100 kg BW/day). The lambs were weaned at 90 days of age, remaining as a single group throughout their life, grazing in the same paddocks and receiving the same reproductive, nutritional and health management.

6.4.3. Experimental animals

A total of 20 non-pregnant and non-lactating, six years old, Corriedale ewes (11 born to HPA mothers and 9 born to LPA) were used. The live weight (LW) and body condition score (BCS, scale 1 = emaciated, 5 = obese; Jefferies, 1961) were 54.5 ± 1.67 kg, and 3.64 ± 0.13 and: 52.89 ± 1.84 and 3.50 ± 0.15 (mean \pm sem) for HPA and LAP, respectively. Six days before the experiment began, intravaginal sponges containing 60 mg of medroxyprogesterone (Progespon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) were inserted to all ewes.

6.4.4. Social isolation and novel object test

Ewes were individually isolated for 5 min in an unknown pen (4 m x 4 m floor, divided into 16 quadrants, and 4 m-high white walls) without visual and olfactory contact with humans or other animals. Five min after beginning the isolation test, a person dropped a novel object (a basketball ball with a diameter of 23 cm) into the pen from the middle of one side of the pen. The object was always dropped by the same person at the same height and side. The test were carried out during two consecutive days (10 ewes/day), between 08:00 h and 15:00 h, alternating ewes from each group over the days. During the test, the area was video recorded with two cameras on the roof (Canon VIXIA HF R800 and Sony DCR-5R85,

manufactured in China) to record the behaviours without observing the animals directly. Before testing each ewe, the floor of the pen and the basketball ball were carefully cleaned with sodium hypochlorite solution. The test were applied over two days, with 5 HPA and 5 LPA ewes tested the first day, and 6 HPA and 4 LPA ewes the second. The order of the test was alternated between ewes from each treatment.

Before and after the test, all the ewes were allocated in two sampling pens (6.0 m x 6.0 m; one located at the entrance of the test and the other at the exit), where they remained with other ewes from the same flock to avoid remaining isolated, with free access to shadow and water. The heart and respiratory rates and rectal and surface temperatures were recorded 5 min before the test began (-5 min), at the end of the test (time 0), and 10, 20, 30 and 45 min after the test (see description in section 2.5.1.). The blood samples were collected by jugular venipuncture 5 min before the test began (-5 min), at the end of the test (time 0), and 10, 20, 30, 45, 60, 90 and 120 min after the test. The blood samples were placed in tubes without anticoagulants and with iodoacetate and heparin (Eurotubo, Deltalab, Rubi, Spain). Samples were centrifuged for 15 min at 3000 g, and plasma or serum were separated and frozen at -20 °C.

6.4.5. Physiological recordings: Heart rate, respiratory rate and rectal temperature

Heart rate was measured with the help of a stethoscope, counting the beats during 15 s by auscultation (beats/min). The respiratory rate was recorded by observing rib-abdominal movements for 15 s. The rectal temperature was recorded with a digital thermometer.

6.4.6. Surface temperature

The surface temperature of the left cornea, left ear, snout and vulva were measured using an infrared camera [laser: Class 2, 0.05–40 m \pm 1% of the measured distance, infrared resolution photos: 464 \times 348 pixels, object range temperature: 20 to +120 °C, accuracy: \pm 0.3 °C, field of view: 24 \times 18 (18 mm lens), FLIR E95, Estonia]. The camera was calibrated to environmental temperature (mean \pm SD: 21.0 \pm 0.6 °C), relative humidity (mean \pm SD: 74.0 \pm 2.9%), and reflective temperatures. The emissivity was set to 0.98, according to Labeur et al. (2017) and Menant et al. (2020). A single operator took all the images from a standard distance of 1.0 m from the ewe. The pictures were analysed using the FLIR Tools software. Areas were delineated from the infrared images using a circle on different areas without wool. Regions of interest were defined on the left cornea, close to the lacrimal caruncle (corneal temperature), on the central part of the vulva, on the left ear, and the snout, according to Corrales-Hlinka et al. (2023). The software calculated the minimum, mean and maximum temperatures of each area.

6.4.7. Blood samples, metabolites and hormonal determinations

Serum total protein, albumin, and plasma glucose concentrations of all samples were measured with commercial kits using an automatic equipment (Humastar 80, Human, Wiesbaden, Germany) at the Unidad Académica Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay. Calibration controls were included for biochemical measurements. Cortisol concentrations were measured using a commercial radioimmunoassay kit (CORT-CT2; Cisbio Bioassays, France) at the Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay. The sensitivity of the assay was 3.6 nmol/L, and the intra-assay and inter-assay coefficients of variation were

17.1 and 17.4% for low controls, 6.9 and 11.6% for medium controls, and 5.7 and 12.4% for high controls, respectively.

6.4.8. Behaviour recordings

One trained observer recorded the following variables from the videos during both periods of the test: (1) the number of crossed lines in the periphery and central squares (ewes crossed the lines with both forelegs), (2) vocalisations, (3) latency to the first vocalisation, (4) eliminations events (urinations + defecations), (5) sniffing (the ewe sniffed the floor for at least 3 s), (6) the numbers of freezing (the ewe was standing up alert for at least 3 s), (7) escape attempts (ewes jumped against the wall), and (8) the total time on the periphery squares (the ewe maintained at least both forelegs on the peripheral squares). After introducing the novel object into the pen, the following behaviours were also recorded: (10) latency to the first approach to the ball (the ewe approached less than one body of distance from the ball), (11) time close to the ball (the ewe remained closer to one body length or less from the ball), (12) the number of sniffs to the ball (the ewe touched and sniffed the ball for at least 3 s), (13) latency to first sniff to the ball, (14) number of times that ewes looked at the ball (the head of the ewe was directly orientated toward the ball, regardless of the position of the ewe in the testing area), (15) time looking at the ball, and (16) number of aggressive behaviours (ewes kicked or pushed the ball). The latency to the first vocalisation was considered as 10 min if the ewe did not display it until the end of this period. The latencies to the first approach and the first sniff to the ball were considered 5 min if the ewe did not display these behaviours during the test.

6.4.9. Statistical analyses

The normal distribution of the data was confirmed using the Shapiro-Wilk test. Non-normal behavioural variables were analysed with the Mann-Whitney test. The remaining data were analysed using the mixed procedure of SAS (platform SAS OnDemand for Academic), including the treatment as the main effect and the ewe, and the day of the test as random effects. The behaviours recorded before and after introducing the novel object to the pen that were normally distributed, heart and respiratory rates, body temperatures, glycaemia, serum cortisol and protein concentrations were compared with a mixed model, including the time as the repeated effect. The model of the behaviors included the treatment of the mothers (HPA vs. LPA), and the day of the test as random effects. On the other variables, the model also included the time, and their interaction between treatments and time as fixed effects, and the ewe and the day of the test as random effects. When the estimate of the covariance parameter for the mother's block was zero or near zero, it was removed from the model. Post-hoc comparisons were made with the Tukey–Kramer test. Data analysed with the mixed models are presented as LSmeans \pm SEM, and those analysed with the Mann-Whitney test as mean \pm SEM. Differences were considered significant when $P \leq 0.05$ and tendencies when $0.05 < P \leq 0.1$.

6.5. RESULTS

6.5.1. Behaviours

The behaviours recorded during social isolation followed by exposure to a novel object are presented in Table 1. The number of times looking at the novel object tended to be greater in HPA ewes than LPA ($P = 0.08$; Table 1). The other variables recorded during the test were not different between treatments. Solely 4 out of 11 HPA ewes and 2 out of 9 LPA ewes urinated or defecated during the test. Only two LPA ewes attempted to escape, while none of the HPA ewes attempted, and two ewes from each treatment displayed aggressive behaviour toward the ball, so these behaviours were not analysed, and therefore, not presented in the Table.

Table 1. Behaviours recorded during 5 min of social isolation followed by exposure to a novel object for another 5 min in aged female offspring born to mothers that grazed on high (HPA:10-12 of DM/100 kg of BW/day) and low (LPA: 5-8 of DM/100 kg of BW/day) forage allowance of natural grassland during gestation.

	HPA	LPA	P
<i>First 5 min: social isolation</i>			
Periphery lines crossed (n)	34.3 ± 4.4	39.0 ± 8.0	ns ¹
Centre lines crossed (n)	17.1 ± 4.2	24.1 ± 6.6	ns ¹
Time in periphery squares (s)	221.5 ± 17.4	225.2 ± 19.2	ns ²
Freezing (n)	9.3 ± 2.7	7.8 ± 2.7	ns ²
Vocalisations (n)	16.9 ± 4.8	11.1 ± 3.0	ns ¹

Latency to first vocalication (s)	9.3 ± 2.7	7.8 ± 2.7	ns ¹
Sniffing (n)	14.4 ± 1.5	14.1 ± 1.6	ns ²
<i>Second 5 min: exposure to a novel object</i>			
Periphery lines crossed (n)	21.8 ± 7.3	24.4 ± 7.6	ns ²
Centre lines crossed (n)	11.0 ± 1.8	15.4 ± 4.8	ns ¹
Time in periphery squares (s)	207.8 ± 14.5	214.1 ± 16.0	ns ²
Freezing (n)	5.1 ± 0.4	5.0 ± 0.8	ns ¹
Vocalisations (n)	9.4 ± 3.6	5.7 ± 1.9	ns ¹
Sniffing (n)	8.0 ± 1.0	7.9 ± 1.1	ns ²
<i>Second 5 min: interactions with the novel object</i>			
Latency to the first approach to the ball (s)	68.7 ± 21.1	57.8 ± 34.7	ns ¹
Latency to first sniff the ball (s)	92.5 ± 26.8	77.4 ± 42.2	ns ¹
Number of sniffings	3.5 ± 0.7	2.6 ± 0.9	ns ¹
Number of times looking at the ball	6.7 ± 1.0	4.7 ± 0.8	0.08 ¹
Time looking at the ball (s)	60.2 ± 8.4	41.0 ± 9.3	ns ²
Time close to the ball (s)*	111.6 ± 24.5	81.0 ± 26.0	ns ²

BW: body weight; DM: dry matter.

1: variables were compared with the Mann-Whitney test.

2: variables were compared with the mixed procedure (the model included the treatments as the main effect and the ewe and the day of the test as random effects).

*Time close to the ball (the ewe maintained one body or less of distance from the ball).

6.5.2. Heart rate, respiratory rate and rectal temperature

The nutritional treatments applied to the mothers did not affect these variables, and no treatment and time interaction was observed. However, these variables varied with time ($P < 0.03$): the heart rate did not augment after the test but decreased from -5 min until 20 min (Figure 1A). The respiratory rate tended to decrease from -5 min until 0 min ($P = 0.08$) and increased from 0 min until 30 min ($P = 0.0003$) (Figure 1B). The rectal temperature increased from -5 min to 0 min ($P < 0.0001$) (Figure 1C)

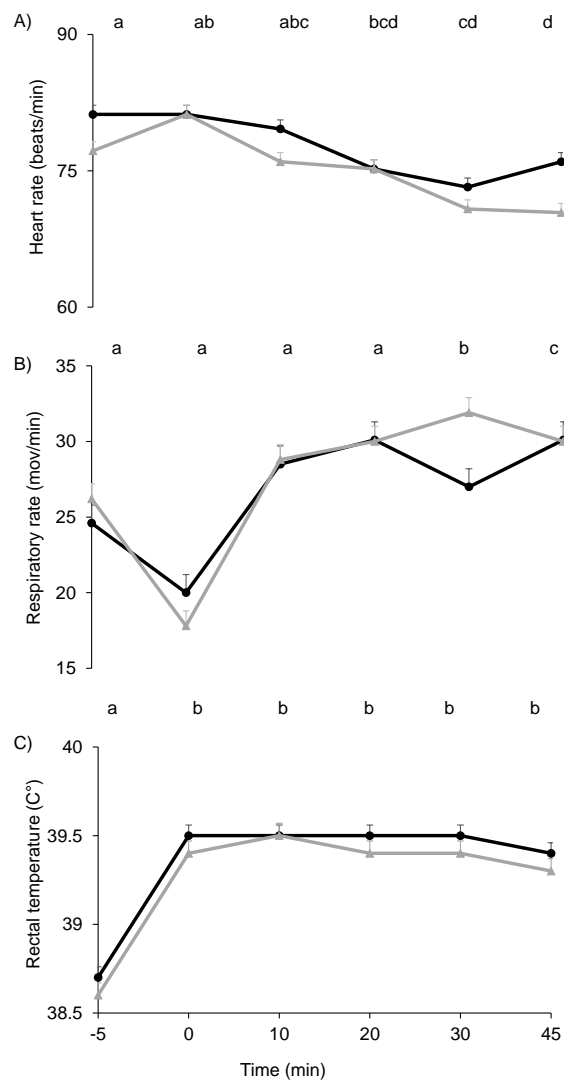


Fig. 1. Heart rate (A), respiratory rate (B) and rectal temperature (C) of LPA (—▲—) or HPA ewes (—●—) before and after social isolation followed by exposure to a novel object. Non-gestating six-year-old ewes born to mothers that grazed on high (HPA: 10-12 DM/100 kg BW/day) or low (LPA: 5-8 DM/100 kg BW/day) forage allowance of natural grassland from 23 days before conception until 122 days of gestation. Variables were measured 5 min before the test, immediately after the test (time 0), 10, 20, 30, and 45 min after the test. Different letters indicate significant differences between time ($P < 0.05$).

6.5.3. Surface temperature

Surface temperatures were not affected by the treatment. All the recorded surface temperatures, except the snout's minimum and average surface temperatures, varied with time, with no interactions between treatment and time (Table 2). The minimum surface temperature of the vulva ($P = 0.06$) and left cornea ($P = 0.07$) tended to change with time. The maximum and average surface temperature of the vulva increased from -5 min until 0 min ($P < 0.0001$) but decreased from 10 min until 20 min ($P < 0.0001$). The left cornea's maximum and average surface temperatures increased from -5 min to 0 min after the test ($P < 0.0001$). The maximum surface temperatures of the left ear increased from -5 min until 0 min ($P < 0.0001$), but the minimum and average surface temperatures increased from -5 min until 10 min ($P < 0.0001$). Only the maximum surface temperature of the snout was affected by the time, and it increased from -5 min to 0 min ($P < 0.0001$).

Table 2. The maximum, minimum and average body surface temperature of the vulva, left cornea, left ear and snout before and after the social isolation test followed by exposure to a novel object in aged female offspring born to mothers that grazed on high (HPA:10-12 of DM/100 kg of BW/day) or low (LPA: 5-8 of DM/100 kg of BW/day) forage allowance of natural grassland during gestation.

The least-square means	P
------------------------	---

	HP		SE	Treatment		Treatment*Time
	A	LPA	M	t	Time	e
		37.				
		6				
Vulva (°C)		35.				
Maximum	37.8	3	0.4	ns	0.004	ns
Minimum	35.2	36.	0.5	ns	0.06	ns
Average	36.8	6	0.4	ns	0.003	ns
		37.				
Left cornea		3				
(°C)		36.				
Maximum	37.4	4	0.2	ns	0.0004	ns
Minimum	36.3	37.	0.2	ns	0.07	ns
Average	37.2	1	0.2	ns	0.004	ns
		37.				
		8				
Left ear (°C)		35.			<0.000	
Maximum	37.9	5	0.2	ns	1	ns
Minimum	35.9	36.	0.5	ns	0.002	ns
Average	37.2	9	0.4	ns	0.002	ns

			37.				
			4				
Snout (°C)			33.				
Maximum	37.4	2	0.3	ns	0.02		ns
Minimum	33.7	35.	0.5	ns	ns		ns
Average	35.9	7	0.4	ns	ns		ns

BW: body weight; DM: dry matter.

6.5.4. Blood samples, metabolites and hormonal determinations

Serum albumin concentration was greater in LPA than HPA ewes (3.2 ± 0.1 g/dL vs 3.0 ± 0.1 g/dL, $P = 0.02$). Serum albumin concentration did not vary with time, and there was no interaction between treatment and time. Treatment, time and their interaction did not affect glycaemia and serum total protein concentration. Serum cortisol concentration varied only with time ($P < 0.0001$), increasing from -5 min until 0 min ($P < 0.0001$; Figura 2D).

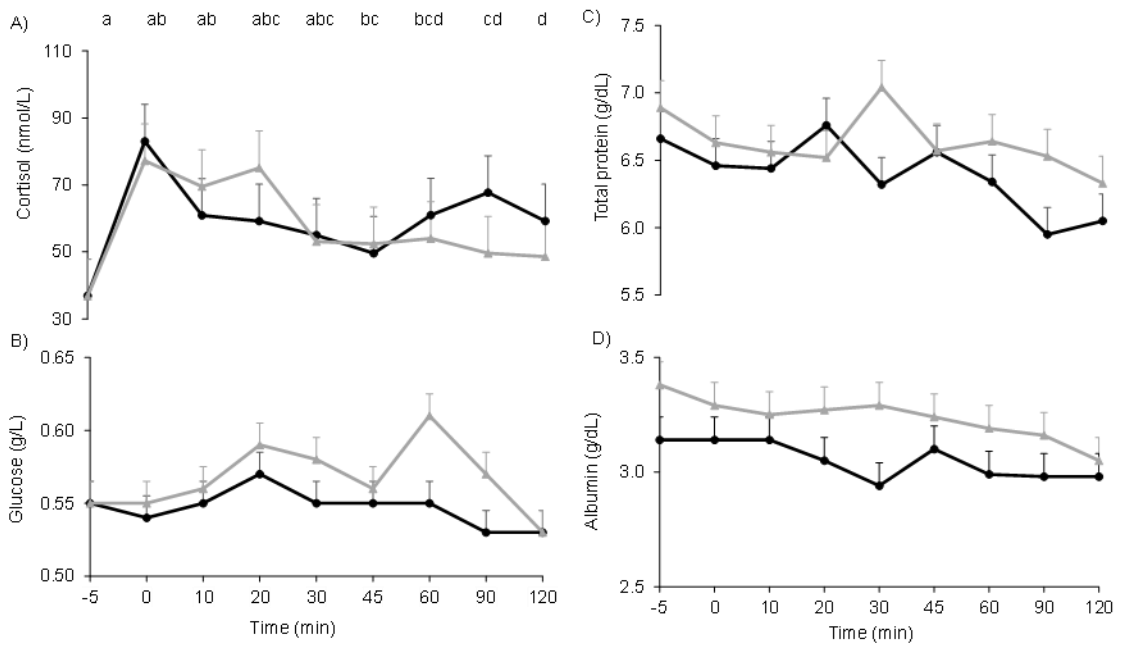


Fig. 2 (A) cortisol, (B) glucose, (C) total protein and (D) albumin concentrations of LPA (—▲—) or HPA ewes (—●—) before and after social isolation followed by exposure to a novel object. Non-gestating six-year-old ewes born to mothers that grazed on high (HPA: 10-12 DM/100 kg BW/day) or low (LPA: 5-8 DM/100 kg BW/day) forage allowance of natural grassland from 23 days before conception until 122 days of gestation. Variables were measured 5 min before the test, immediately after the test (time 0), 10, 20, 30, 45, 60, 90 and 120 min after the test. Different letters indicate significant differences between time ($P < 0.05$).

6.6. DISCUSSION

Undernourishment of pregnant mothers reared in extensive grazing systems did not influence the coping style of their aged offspring to social stress and fear of novelty. Isolation from the flock and the sudden exposition to a novel object increased cortisol concentration in both groups of ewes, demonstrating the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (Matteri et al., 2000). Surface and rectal temperatures were also raised in both groups after the test, but no other

physiological or behavioural changes were altered in response to the studied stressors. After the novel object was released in the unknown test pen, the ewes reduced locomotion and fear and increased exploratory behaviours toward the novel object. Although these changes were independent of the nutritional treatment, the motivation of the ewes for investigating the novel object suggests increased curiosity and low fear reaction (Mansour et al., 2003; Nielsen, 2020). Accordingly, in rats, a novel object placed in a known environment triggers an avoidance response, while the same object placed in a novel environment increases contact with it (Misslin and Ropartz, 1981). Additionally, HPA ewes were slightly more curious as they tended to look more often at the ball, an issue that remains to be determined. In general, the experimental ewes responded with low-stress levels compared to those of ewes in similar studies (Freitas-de-Melo et al., 2016b; 2022a). These results might be due to the general handling that the experimental sheep received at the farm, such as the use of good handling practices that likely favoured their animal welfare status. Rearing animals in positive surroundings has been associated with less fearful and more exploratory behaviours towards novel objects (Beattie et al., 2000). The low frequency of urination, defecation, escape attempts, and aggression toward the ball reinforces the concept that ewes reacted with low fear despite the treatments. The animals' age could also explain this low fear reaction displayed by ewes, as older ewes display a lower fear reaction than younger ones (Viérin and Bouissou, 2002). Although undernourishment during gestation in extensive grazing conditions did not influence ewes' fearfulness and stress responsiveness, further stressful challenges should be tested before discarding those potential effects.

Maternal nutritional restriction during pregnancy increased serum albumin concentration, independently of the stressors applied. In a previous study with the same animals, the offspring born to nutritionally restricted ewes during gestation had lower albumin concentration variation after artificial weaning (a stressful

situation) than those lambs whose mothers were not subjected to the same nutritional restriction (Freitas-de-Melo et al., 2017). Changes in albumin concentrations are stress biomarkers but also reflect the metabolic status of animals (Overton et al., 2017). The albumin concentration of both groups of ewes was at normal levels (El-Sherif and Assad, 2001), and all ewes had adequate BCS. This suggests that the protein consumption in the diet was not limiting (Caldeira et al., 2007), likely because the protein content in the forage is highest in autumn (Freitas-de-Melo et al., 2018). Therefore, considering that in previous studies, energetic metabolic pathways differed between groups (Jorge-Smeding et al., 2021), we can not discard that the nutritional treatment during prenatal life might also influence protein metabolism pathways in aged ewes.

Although the nutritional treatment of the mothers did not affect the surface temperatures in this experiment, in a recently published study performed with the same group of ewes, surface temperature differed between groups in response to a chronic stressor (shearing) (Corrales-Hlinka et al., 2023). In the aforementioned study, the ewes remained outdoors, exposed to variations in the ambient temperature and the surface temperature was measured some days after shearing, most likely indicating a difference between groups on the thermoregulation mechanisms. In the present experiment, acute stressors likely changed the blood flow distribution, increasing the body surface temperature as reported in ewes after social stress (Freitas-de-Melo et al., 2016b). Therefore, fetal programming had a more significant impact on thermoregulation control than on the acute stress response pathways in aged ewes. However, further studies might be designed before reaching definitive conclusions.

6.7. CONCLUSION

In conclusion, the undernourishment of pregnant ewes did not modify the stress biomarkers of ewes to social isolation followed by exposure to a novel object. However, during the test, the number of times ewes born to undernourished dams looked at the novel object tended to be lower. The undernourishment of the mothers during gestation increased the albumin concentration of aged ewes, independently of the stressors applied, suggesting possible differences in the protein metabolism.

6.8. REFERENCES

- Abecia, J. A., Casao, A., Pascual-Alonso, M., Lobón, S., Aguayo-Ulloa, L. A., Meikle, A., F. Forcada, C. Sosa, R. H. Marín, M. A. Silva y Maria, G. A., 2014. The effect of periconceptional undernutrition of sheep on the cognitive/emotional response and oocyte quality of offspring at 30 days of age. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 5, 79-87.
- Abud, M. J., Bielli, A., Ithurralde, J., Freitas-de-Melo, A., Álvarez-Oxiley, A., López-Pérez, Á, R. Ungerfeld y 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, 471-480.
- Beattie, V. E., O'Connell, N. E., Kilpatrick, D. J. Moss, B. W., 200. Influence of environmental enrichment on welfare-related behavioural and physiological parameters in growing pigs. *Anim. Sci.* 70, 443-450. <https://doi.org/10.1017/s1357729800051791>
- Caldeira, R. M., Belo, A. T., Santos, C. C., Vazques, M. I., y Portugal, A. V., 2007. The effect of body condition score on blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Rumin. Res.* 68, 233-241.
- Calkins, K., y Devaskar, S. U., 2011. Fetal origins of adult disease. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care* 41, 158-176.
- Carámbula, M., 1991. Aspectos relevantes para la producción forrajera. INIA Serie técnica.
- Chadio, S.E., Kotsampasi, B., Papadomichelakis, P., Deligeorgis, S., Kalogiannis, D., Menegatos, I., Zervas, G., 2007. Impact of maternal undernutrition on the hypothalamic–pituitary–adrenal axis responsiveness in sheep at different ages postnatal. *J. Endocrinol.* 192, 495-503.
- Corrales-Hlinka, F., Freitas-de-Melo, A., Ungerfeld, R., Pérez-Clariget, R., 2023. Thermoregulatory, metabolic and stress responses to spring shearing of aged ewes born to undernourished mothers. *J. Therm. Biol.* 113, 103503.

- Donovan, E. L., Hernandez, C. E., Matthews, L. R., Oliver, M. H., Jaquiery, A. L., Bloomfield, F. H., y Harding, J. E., 2013. Periconceptional undernutrition in sheep leads to decreased locomotor activity in a natural environment. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 4, 296-299.
- El-Sherif, M. M. A., y Assad, F., 2001. Changes in some blood constituents of Barki ewes during pregnancy and lactation under semi-arid conditions. *Small Rumin. Res.* 40, 269-277.
- Erhard, H. W., Boissy, A., Rae, M. T., y Rhind, S. M., 2004. Effects of prenatal undernutrition on emotional reactivity and cognitive flexibility in adult sheep. *Behav. Brain Res.* 151, 25-35.
- Forkman, B., Boissy, A., Meunier-Salaün, M. C., Canali, E., y Jones, R. B., 2007. A critical review of fear test used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiol. Behav.* 92, 340-374.
- Freitas-de-Melo, A., Garcia Kako Rodriguez, M., Crosa, C., y Ungerfeld, R., 2022a. Social stress during the estrus or luteal phase in sheep. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 1-9.
- Freitas-de-Melo, A., Ungerfeld, R., 2022b. Impact of Sex Steroids on the Stress Response and Welfare in Female Farm Ruminants. In *Sustainable Agriculture Reviews 57: Animal Biotechnology for Livestock Production 2* (pp. 1-26). Cham: Springer International Publishing.
- Freitas-de-Melo, A., Ungerfeld, R., Hotzel, M.J., Abud, M.J., Alvarez-Oxiley, A., Orihuela, A., Damian, J.P., Perez-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.
- Freitas-de-Melo, A., y Ungerfeld, R., 2016a. Progesterona y respuesta de estrés: mecanismos de acción y sus repercusiones en rumiantes domésticos. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 7, 185-199.

- Freitas-de-Melo, A., Damián, J. P., Hötzel, M. J., Banchero, G., Ungerfeld, R., 2016b. Progesterone pretreatment increases the stress response to social isolation in ewes. *Hormones* 15, 81-87.
- Freitas-de-Melo, A., Ungerfeld, R., Orihuela, A., Hötzel, M. J., Pérez-Clariget, R., 2017. Early mother-young relationship and feeding behaviour of lambs are unaffected by low pasture allowance until the beginning of the last third of gestation in single-bearing ewes. *Anim. Prod. Sci.* 58, 930-936.
- 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. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 199, 9-16.
- Gao, F., Liu, Y., Li, L., Li, M., Zhang, C., Ao, C., y Hou, X., 2014. Effects of maternal undernutrition during late pregnancy on the development and function of ovine fetal liver. *Anim Reprod. Sci.* 147, 99-105.
- Grandin, T., y Shivley, C., 2015. How farm animals react and perceive stressful situations such as handling, restraint, and transport. *Animals*, 5, 1233-1251.
- Hargreaves, A. L., y Hutson, G. D., 1990. Changes in heart rate, plasma cortisol and haematocrit of sheep during a shearing procedure. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 26, 91-101.
- Hawkins, P., Steyn, C., McGarrigle, H.H.G., Saito, T., Ozaki, T., Stratford, L.L., Noakes, D.E., Hanson, M.A., 1999. Effect of maternal nutrient restriction in early gestation on development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in fetal sheep at 0.8–0.9 of gestation. *J. Endocrinol.* 163, 553-561.
- Ithurralde, J., Genovese, P., Abud, M. J., López-Pérez, Á., Pérez-Clariget, R., y 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.

- Jorge-Smeding y Perez-Clariget, R., 2021. Programación fetal del metabolismo: cambios en el metaboloma plasmático de ovejas adultas. 44º Congreso de la Asociación Argentina de Producción Animal. Modalidad Virtual 17-19, 2021.
- Labeur, L., Villiers, G., Small, A. H., Hinch, G. N., y Schmoelzl, S., 2017. Infrared thermal imaging as a method to evaluate heat loss in newborn lambs. *Res. Vet. Sci.* 115, 517-522.
- Mansour, A. A., Babstock, D. M., Penney, J. H., Martin, G. M., McLean, J. H., y Harley, C. W., 2003. Novel objects in a holeboard probe the role of the locus coeruleus in curiosity: Support for two modes of attention in the rat. *Behavi. Neurosci.*, 117, 621.
- Matteri, R.L., Carroll, J.A., Dyer, C.J., 2000. Neuroendocrine responses to stress. In: Moberg, G.P., Mench, J.A. *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. Ed. CABI Publishing 2ª ed. Cambridge, pp. 43-76.
- Menant, O., Ungerfeld, R., Pérez-Clariget, R., y Freitas-de-Melo, A., 2020. Is body surface temperature measured on the single lambs' back a reliable indicator of the ewe-lamb bond around birth?. *J. Therm. Biol.* 93, 102699.
- Misslin, R., Ropartz, P., 1981. Responses in mice to a novel object. *Behaviour* 78, 169-177.
- Moberg, G. P., 1987. A model for assessing the impact of behavioral stress on domestic animals. *J. Anim. Sci.* 65, 1228-1235.
- Morris, S. T., Kenyon, P. R., Burnham, D. L., y McCutcheon, S. N., 1999. The influence of pre-lamb shearing on lamb birthweight and survival. In *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* (pp. 95-98).
- Nielsen, B., 2020. *Asking Animals: An Introduction to Animal Behaviour Testing*. CABI.

- Overton, T. R., McArt, J. A. A., y Nydam, D. V., 2017. A 100-Year Review: Metabolic health indicators and management of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 100, 10398-10417.
- Parrott, R. F., Houpt, K. A., y Misson, B. H., 1988. Modification of the responses of sheep to isolation stress by the use of mirror panels. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 19, 331-338.
- Iglesias, R. R., Irazoqui, H., Ciccioi, N. H., Giglioli, C., 1993. Seasonality of oestrus and ovulation in Corriedale ewes: repeatabilities and phenotypic correlations. *J. Agricul. Sci.* 120, 115-119.
- Simitzis, P. E., Charismiadou, M. A., Kotsampasi, B., Papadomichelakis, G., Christopoulou, E. P., Papavlasopoulou, E. K., y Deligeorgis, S. G., 2009. Influence of maternal undernutrition on the behaviour of juvenile lambs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 116, 191-197.
- Viérin, M., y Bouissou, M. F., 2002. Influence of maternal experience on fear reactions in ewes. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 75, 307-315.
- Zócalo, Y., Ungerfeld, R., Pérez-Clariget, R., y Bia, D., 2020. Maternal nutritional restriction during gestation impacts differently on offspring muscular and elastic arteries and is associated with increased carotid resistance and ventricular afterload in maturity. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 11, 7-17..

7. DISCUSIÓN GENERAL

La subnutrición materna durante la gestación determinó cambios comportamentales y fisiológicos en las hijas adultas luego de ser sometidas a diferentes desafíos ambientales. En el experimento 1, luego de la esquila, las ovejas del grupo BOF rumiaron menos, permanecieron más tiempo paradas y tuvieron menor temperatura superficial en la vulva 15 días después de la esquila que las ovejas del grupo AOF. Además, hay evidencias que permiten pensar que las ovejas de los grupos AOF y BOF eran diferentes a los 6-6,5 años de edad, independientemente de los desafíos estresantes. En el experimento 2, las concentraciones sanguíneas de albúmina eran diferentes entre grupos, y en el experimento 1, las temperaturas superficiales de hocico y oreja también fueron diferentes entre grupos; además, la concentración de insulina tendió a ser diferente entre las ovejas AOF y BOF. Estos resultados son consistentes y respaldan hallazgos previos en estos mismos animales. En 2020, Zócalo et al. reportaron que las ovejas BOF presentaban una mayor resistencia en la arteria carótida y tenían menores diámetros de la arteria femoral. Por otro lado, Pérez-Clariget et al. (2023) encontraron que las ovejas BOF eran hiperfágicas, preferían los alimentos grasos por sobre los proteicos, y Jorge-Smeding y Pérez-Clariget (2021) reportaron diferencias en el metaboloma sanguíneo y sugieren que el metabolismo energético y el del triptófano también presentan diferencias. Finalmente, al momento de la faena de estas ovejas, a los 7 años de edad, se llevaron a cabo mediciones de conformación y peso de órganos. Se encontró que las ovejas BOF presentaban una mayor longitud cráneo-caudal y tendían a tener corazones más livianos que las ovejas AOF (resultados no publicados). Por lo tanto, el presente trabajo refuerza el concepto de que las alteraciones que se produjeron durante el desarrollo fetal generaron consecuencias anatómo-fisiológicas, metabólicas y comportamentales apreciables incluso a los 6,5 años de edad, a pesar de haber sido manejadas bajo condiciones similares. En efecto,

los animales utilizados en este experimento fueron tratados de forma similar nutricional, reproductiva y sanitariamente en condiciones extensivas sobre campo natural a lo largo de toda su vida; a pesar de ello, manifestaron diferencias antes de ser sometidos a los desafíos ambientales. Parece que el manejo a lo largo de toda la vida extrauterina no fue suficiente para compensar los efectos provocados por la restricción nutricional durante el desarrollo embrionario-fetal, lo que confirma que las alteraciones en la programación fetal tienen consecuencias en la edad adulta. En los últimos años, se han desarrollado estudios sobre cómo los mecanismos epigenéticos regulan la expresión de genes claves en células de fetos que sufrieron restricción nutricional intrauterina (Sartori et al., 2020). Estos mecanismos involucran cambios químicos que se producen sobre el ADN, pero también sobre las proteínas que interaccionan con el propio ADN, las cuales modelan y regulan la expresión de genes a corto y largo plazo, sin producir alteraciones sobre el código genético (Sarkies, 2020). Los cambios epigenéticos que se producen en un feto que se encuentra en momentos críticos de su desarrollo pueden derivar en alteraciones permanentes en el metabolismo del individuo (Namous et al., 2018). Por lo que a un mismo genotipo le pueden corresponder diferentes fenotipos según las condiciones intrauterinas en las que el embrión-feto se desarrolle.

Independientemente del grupo al que pertenecían las ovejas, durante el primer experimento se esquilieron y se mantuvieron a pastoreo, y se observaron cambios conductuales similares a los previamente reportados por Ungerfeld et al. (2018) y Mousa-Balabel y Salama (2010). En la presente tesis, las ovejas recién esquiladas y expuestas a las inclemencias del ambiente aumentaron el tiempo pastando y paradas, disminuyeron el tiempo rumiando, se vieron afectas las temperaturas superficiales de zonas deslanadas (la oreja, el hocico y la vulva) y se observó un incremento en las concentraciones sanguíneas de albúmina y de proteínas totales. Por otra parte, en el segundo experimento, luego del período

de aislamiento social y presentación de un objeto novedoso, se observó en las ovejas, independientemente del grupo experimental, un incremento de las frecuencias cardíacas y respiratorias y de las temperaturas rectal y superficiales, además de un aumento de la concentración sérica de cortisol, lo que indica que este desafío generó una marcada respuesta de estrés en ambos grupos de ovejas (Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016). La sumatoria de los resultados obtenidos permite confirmar que los desafíos planteados (esquila y aislamiento social/objeto novedoso) fueron efectivos para inducir estrés y/o cambios termorregulatorios en las ovejas y que estas respondieron frente a los estímulos acorde a lo reportado en la literatura (Freitas-de-Melo et al., 2022, Ungerfeld et al., 2021, Piccione et al., 2002).

Por otro lado, cabe destacar que, de manera general, en ambos experimentos de esta tesis se midieron las mismas variables de respuestas. Sin embargo, hay diferencias en los resultados obtenidos entre los trabajos. Por ejemplo, mientras que en el experimento 1 hubo un claro efecto del tratamiento en las temperaturas superficiales, en el experimento 2 no se observó dicho efecto. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el tipo de desafío: en el experimento 1 al esquilar las ovejas, es decir, al remover el vellón protector, se las sometió a un estrés térmico directo, mientras que el experimento 2 no implicó un desafío térmico para el animal. Aún más, en el experimento 1 se esperaban cambios en la temperatura superficial relacionados con mecanismos termorregulatorios, mientras que en el experimento 2 se esperaban cambios debidos a la respuesta de estrés. La hipótesis planteada era que la alimentación de las madres durante la gestación afectaría las variaciones en las temperaturas corporales en estas situaciones. Sin embargo, se detectaron diferencias entre grupos en la capacidad termorreguladora después de la esquila, pero no después de que se sometieran a desafíos que causaron estrés agudo. La literatura es consistente al reportar que las crías gestadas por madres subnutridas presentan mayores dificultades para

regular su temperatura corporal que las crías de los grupos controles. En este sentido, Tonkiss et al. (2003), utilizando ratas machos de 7, 9 y 11 días de edad en situaciones ambientales controladas, nacidos de madres sometidas o no a dietas hipoproteicas, encontraron que la temperatura corporal a los 7 días era menor en los hijos de madres restringidas desde el punto de vista proteico que las nacidas de las madres controles, pero esta diferencia se perdía con la edad. Además, estos autores encontraron una tendencia a una mayor pérdida de temperatura corporal a los 7 días en los hijos de madres restringidas en comparación con los no restringidos. De manera similar, Luz et al. (2003) también compararon ratas nacidas de madres alimentadas con el 50% de sus requerimientos y controles y reportaron que las crías del primer grupo fallaron en mantener la temperatura corporal. Los resultados del experimento 1 suman evidencias a lo previamente reportado en roedores y confirman que la subnutrición intrauterina tiene efectos de largo plazo sobre la capacidad termorregulatoria en ovejas.

Los resultados de ambos experimentos también difirieron en la bioquímica sanguínea, ya que las ovejas del grupo BOF tuvieron una mayor concentración de albúmina que las de AOF solo en el experimento 2. Esta diferencia podría, al menos en parte, ser atribuida a la diferente disponibilidad y calidad de las pasturas ofrecidas durante los dos trabajos. Si bien las ovejas estaban en campo natural durante todo el período que duró el experimento 1 y continuaron en las mismas condiciones hasta el experimento 2, el campo natural sufre variaciones de calidad entre primavera y verano. Dichas variaciones son especialmente marcadas en el contenido proteico (Casal et al., 2014), lo que podría provocar diferencias en la composición de los nutrientes ingeridos. Es bien sabido que la albúmina se sintetiza en el hígado a partir de los aminoácidos obtenidos de la dieta, por lo que niveles de proteína bajos en los alimentos determinarían niveles bajos de albúmina en plasma (Rothschild et al., 1974). El experimento 1 se realizó

en el primer mes de la primavera, por lo que durante el período anterior (invierno), las pasturas ofrecidas a las ovejas tenían un contenido inferior de proteína y también una masa de forraje menor (Casal et al., 2014). Por otro lado, la esquila es un potente estimulador del consumo voluntario (Wheeler et al., 1963) y este estímulo lo recibieron cuando las pasturas tenían una mayor disponibilidad y el máximo contenido de proteína. Durante el verano, período previo al experimento 2, si bien el contenido proteico es menor que en la primavera, la masa forrajera es mayor. En esas condiciones, es posible que las ovejas BOF aumentaran más su consumo voluntario que las de AOF, considerando que presentan hiperfagia en condiciones *ad libitum* (Pérez-Clariget et al., 2023), sin que ello se viera reflejado en el peso o la condición corporal, pero sí en la concentración de albúmina en sangre. Finalmente cabe resaltar que, en el experimento 2, las ovejas fueron tratadas con esponjas intravaginales de medroxiprogesterona, mientras que, en el experimento 1, estaban en anestro estacional. La progesterona en concentraciones elevadas disminuye la respuesta al estrés en ovinos (Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016); sin embargo, la esquila es un potente estresor que provoca importantes cambios tanto fisiológicos como comportamentales tanto en ovejas preñadas como no preñadas (Ungerfeld y Freitas-de-Melo, 2019). Por otro lado, se debe tener en cuenta que lo que se utilizó para uniformizar el estatus reproductivo de las ovejas en otoño fue medroxiprogesterona, no progesterona, por lo que sería improbable que las diferencias observadas entre trabajos sean debido al uso de estas (Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2022).

Considerando que, en los sistemas de producción ovina, las hembras son retenidas con fines reproductivos, los resultados de esta tesis tomados en conjunto permiten plantear que la oferta de forraje ofrecida a las ovejas gestantes tiene efectos a largo plazo a través de su descendencia. Por tanto, estos resultados remarcan la importancia de la adecuada alimentación de las ovejas

durante la gestación. Esta tesis también amplía y profundiza los resultados que nuestro grupo de investigación había reportado previamente tanto en machos como en hembras en diferentes estadios del desarrollo de los animales. Brevemente, se había demostrado el efecto que la alimentación de las madres durante la gestación y la lactación en condiciones de pastoreo tiene sobre el desarrollo testicular en corderos de 99 días de edad (Bielli et al., 2001), el impacto negativo sobre el número de células de Sertoli de la subnutrición intrauterina en corderos recién nacidos (Bielli et al., 2002) y el efecto de la oferta de forraje sobre la que pastorean las ovejas sobre la circunferencia escrotal y distancia urogenital de sus crías a los 200 días de edad (Bielli et al., 2018). También se había reportado previamente el impacto negativo de una baja oferta de forraje de campo natural ofrecida a ovejas gestantes sobre el peso y desarrollo del aparato reproductor en fetos de 70 días, así como sobre el peso al nacer y de la carcasa, las dimensiones corporales y los pesos de diferentes órganos en neonatos (Abud et al., 2020). Se constató interferencia de la subnutrición maternal sobre la miogénesis tanto en fetos de 70 días como en recién nacidos (Ithurralde et al., 2020). Se reportó el peor desempeño de corderos nacidos de madres restringidas nutricionalmente en el engorde intensivo (Ithurralde et al., 2019), así como peores características de canal y de la calidad de la carne (Ithurralde et al., 2021). En cuanto al efecto de la subnutrición materna sobre el comportamiento de las crías, se había reportado que los corderos machos nacidos de madres restringidas nutricionalmente maman más tarde (Freitas-de-Melo et al., 2015) y pastorean menos tiempo durante el período de lactación (Freitas-de-Melo et al., 2017). En las crías hembras se había observado que las ovejas nacidas de madres restringidas nutricionalmente durante la gestación presentan una mayor resistencia en la arteria carótida a los 2,5 años de edad, lo que indicaría una mayor resistencia en la microcirculación cerebral (Zócalo et al., 2020). Más recientemente, Jorge-Smeding y Pérez-Clariget (2021) reportaron parcialmente

que las ovejas hembras nacidas de madres que pastorearon baja oferta presentan diferencias en el metaboloma sanguíneo con respecto a las hijas de madres no restringidas, con alteraciones en varios metabolitos que sugieren diferencias en el metabolismo energético, el del nitrógeno y el del triptófano, entre otros. Por último, Pérez-Clariget et al. (2023) encontraron que las ovejas que habían sido gestadas por madres restringidas tenían diferencias en el comportamiento ingestivo, preferían los alimentos grasos por sobre los proteicos y presentaban hiperfagia.

En la presente tesis se reportan respuestas a desafíos ambientales, ampliando los aportes de George et al. (2012) sobre efectos de la subnutrición materna en el consumo voluntario, la ganancia de peso, la sensibilidad a la insulina y la concentración hepática de lípidos y glucógeno en la descendencia adultade seis años de edad. Por ello, a los efectos en el comportamiento ingestivo y en el metabolismo energético previamente reportado en las mismas ovejas (Pérez-Clariget et al., 2023, Jorge-Smeding y Pérez-Clariget et al., 2021), se suma que la capacidad termorregulatoria también está afectada, lo que podría significar otra desventaja para la descendencia de ovejas que sufren restricción nutricional durante la gestación, más considerando que los sistemas criadores de ovinos se realizan mayoritariamente a cielo abierto. Los sistemas pastoriles en regiones subtropicales o templadas tienen que tener en cuenta que las pasturas sufren cambios en su tasa de crecimiento y que esta fluctuación puede traer consecuencias de largo plazo si no se alimentan correctamente a las hembras gestantes. Por último, la mayor parte de los manejos que se realizan en las hembras de cría implican niveles de estrés y la respuesta a ellos podría estar condicionada por efectos deletéreos presentes durante la vida intrauterina.

8. CONCLUSIÓN GENERAL

Una baja oferta de forraje de campo natural durante la gestación, al menos al nivel que fue manejado en este experimento, modificó el comportamiento de las crías hembras adultas inmediatamente después de la esquila y su capacidad termorreguladora. Además, elevó las concentraciones de albúmina en las hijas de madres subnutridas. Estos resultados demuestran que la restricción nutricional intrauterina afecta la capacidad termorreguladora de las hijas adultas sin que se demostrara que influye sobre la capacidad de las ovejas en responder a un estresor agudo.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abecia JA, Casao A, Pascual-Alonso M, Lobón S, Aguayo-Ulloa LA, Meikle A, Forcada F, Sosa C, Marín RH, Silva MA, Maria GA. 2014. The effect of periconceptual undernutrition of sheep on the cognitive/emotional response and oocyte quality of offspring at 30 days of age. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 5(2), 79-87.
- Abud MJ, Bielli A, Ithurralde J, Freitas-de-Melo A, Álvarez-Oxiley A, López-Pérez A, Ungerfeld R, Pérez-Clariget R. 2020. Forage allowances offered to pregnant ewes until middle and late gestation: Organ priorities on foetus development. *South African Journal of Animal Science*, 50(3), 471-480.
- Aleksiev Y. 2009. The effect of shearing on the behaviour of some physiological responses in lactating Plevan blackhead ewes. *Bulg. J. Agric. Sci*, 15(5), 446-452.
- Alexander BT, Dasinger JH, Intapad S. 2015. Fetal programming and cardiovascular pathology. *Comprehensive Physiology*, 5(2), 997.
- Ali BH, Al-Qarawi AA, Mousa HM. 2006. Stress associated with road transportation in desert sheep and goats, and the effect of pretreatment with xylazine or sodium betaine. *Research in Veterinary Science*, 80(3), 343-348.
- Anthony RV, Scheaffer AN, Wright CD, Regnault TRH. 2003. Ruminant models of prenatal growth restriction. *Reproduction Supplement*, 61, 183-194.
- Badarnah L, Farchi YN, Knaack U, Carpi A, Brebbia CA. 2010. Solutions from nature for building envelope thermoregulation. *Design y Nature V: Comparing Design in Nature with Science and Engineering*, 5, 251.
- Barker DJP. 2003. The developmental origins of adult disease. *Eur J Epidemiol* 18: 733-736.
- Bartaburu D. 2007. Stress calórico: un tema de bienestar animal y productivo. *Revista del Plan Agropecuario*, (121), 46-49.

- Beede KA, Limesand SW, Petersen JL, Yates DT. 2019. Real supermodels wear wool: summarizing the impact of the pregnant sheep as an animal model for adaptive fetal programming. *Animal Frontiers*, 9(3), 34-43.
- Berretta EJ, San Julian R, Montossi F, Silva JA. 1994. Pasturas naturales y producción ovina en la región de basalto de Uruguay. Congreso mundial Merino. 4.º, Montevideo, Uruguay, pp. 245-262.
- Bianchi Olascoaga G. 1995. Efecto de la esquila sobre la performance ovina. *Notas Técnicas*, 1995 (45): 12 p.
- Bielli A, Genovese P, Marín E, Montaldo S, Abud MJ, López A, Pérez-Clariget R. 2018 Efecto de la oferta de forraje en la oveja gestante sobre el desarrollo del aparato reproductor masculino de sus crías. VI Congreso Aupa - Asociación Uruguaya De Producción Animal. 19-21 de marzo 2018. Campus Interinstitucional Tacuarembó, Uruguay, pp. 93-101.
- Bielli A, Pérez-Clariget R, Pedrana G, Milton J, López A, Blackberry M, Duncombe G, Rodríguez-Martínez H, Martin G. 2002. Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reproduction, fertility and development*. 14: 333-337.
- Bielli A, Katz H, Pedrana G, Gastel MT, Moraña A, Castrillejo A, Lundeheim N, Forsberg M, Rodríguez-Martínez H. 2001. Nutritional management during fetal and postnatal life, and the influence on testicular stereology and Sertoli cell numbers in Corriedale ram lambs. *Small Ruminant Research*, 40(1), 63-71.
- Bloomfield FH, Oliver MH, Giannoulas CD, Gluckman PD, Harding JE, Challis JRG. 2003. Brief undernutrition in late-gestation sheep programs the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adult offspring. *Endocrinology*, 144(7), 2933-2940.
- Boissy A, Fisher AD, Bouix J, Hinch GN, Le Neindre P. 2005. Genetics of fear in ruminant livestock. *Livestock Production Science*, 93(1), 23-32.

- Broom DM. 1988. Welfare, Stress, and the Evolution of Feelings. *Advances in the study of the behavior*, Vol 27, pp. 395.
- Budge H, Bispham J, Dandrea J, Evans E, Heasman L, Ingleton PM, Sullivan C, Wilson V, Stephenson T, Symonds ME. 2000. Effect of maternal nutrition on brown adipose tissue and its prolactin receptor status in the fetal lamb. *PediatricResearch*, 47(6), 781-786
- Burguera B, Muruais C, Peñalva A, Dieguez C, Casanueva FF. 1990. Dual and selective actions of glucocorticoids upon basal and stimulated growth hormone release in man. *Neuroendocrinology*, 51(1), 51-58.
- Burton GJ, Fowden AL. 2012. Review. The placenta and developmental programming: Balancing fetal nutrient demands with maternal resource allocation. *Placenta* 33: S23-S27.
- Calkins K, Devaskar SU. 2011. Fetal origins of adult disease. *CurrProblPediatrAdolescHealth Care* 41: 158-76.
- Canan G, Uría M. 1996. Suplementación invernal de vacas de cría. INIA. *Actividades de Difusión*, 109-112.
- Carámbula M. 1991. Aspectos relevantes para la producción forrajera. INIA Serie técnica.
- Carcangiu V, VaccaGM, Parmeggiani A, Mura MC, PazzolaM, Dettori ML, Bini PP. 2008. The effect of shearing procedures on blood levels of growth hormone, cortisol and other stress haematochemical parameters in Sarda sheep. *Animal*, 2(4), 606-612.
- Casal A, Veyga M, Astessiano AL, Espasandin AC, Trujillo AI, Soca P, Carriquiry M. 2014. Visceral organ mass, cellularity indexes and expression of genes encoding for mitochondrial respiratory chain proteins in pure and crossbred mature beef cows grazing different forage allowances of native pastures. *Livestock Science*, 167, 195-205.
- Cena K, Clark JA, SpotilaJR. 1986. Thermoregulation. *Biology of the Integument: 2 Vertebrates*, 517-534.

- Chadio SE, Kotsampasi B, Papadomichelakis P, Deligeorgis S, Kalogiannis D, Menegatos I, Zervas G. 2007. Impact of maternal undernutrition on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness in sheep at different ages postnatal. *Journal of Endocrinology*. 192:495-503.
- Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 259-284.
- Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. 1998. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann. Intern. Med.* 129:229-40
- Chrousos GP. 2002. Organization and integration of the endocrine system. In *Pediatric Endocrinology*, ed. M Sperling, pp. 1-14. Philadelphia: Saunders
- Cunningham JC, Bradley KG. 2008. *Tratado de fisiología veterinária*. 4.^a ed. Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier.
- Damián JP, Hötzel MJ, Banchemo G, Ungerfeld R. 2018. Growing without a mother during rearing affects the response to stressors in rams. *Applied Animal Behaviour Science*, 209, 36-40.
- Damián JP, Ungerfeld R. 2013. Indicadores de bienestar animal en especies productivas: una revisión crítica. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 21(2), 103-113.
- Damián JP, Ungerfeld R. 2011. The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters. *Reproduction in domestic animals*, 46(4), 646-650.
- De Barbieri I, Montossi F, Viñoles C, Kenyon PR. 2014. Effect of shearing ewes during mid-and late-pregnancy on lambs weight at birth and survival to weaning under grazing conditions in Uruguay. *Small Ruminant Research*, 119(1-3), 28-32.

- Degabriele R, Fell LR. 2001. Changes in behaviour, cortisol and lymphocyte types during isolation and group confinement of sheep. *Immunology and Cell Biology*, 79(6), 583-589.
- Désiré L, Veissier I, Després G, Boissy A. 2004. On the way to assess emotions in animals: do lambs (*Ovis aries*) evaluate an event through its suddenness, novelty, or unpredictability? *Journal of Comparative Psychology*, 118(4), 363.
- DIEA (Dirección de estadísticas agropecuarias). 2021. Anuario Estadístico. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Uruguay. Disponible en: [LIBRO ANUARIO 2021 Web.pdf \(mgap.gub.uy\)](#). Última consulta: 21/08/2023
- Dohms JE, Metz A. 1991. Stress-mechanisms of immunosuppression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 30(1), 89-109.
- Donovan EL, Hernandez CE, Matthews LR, Oliver MH, Jaquiere AL, Bloomfield FH, Harding JE. 2013. Periconceptional undernutrition in sheep leads to decreased locomotor activity in a natural environment. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 4(4), 296-299.
- Doyle RE. 2017. Sheep cognition and its implications for welfare. In *Advances in sheep welfare* (pp. 55-71). Sawston, Woodhead Publishing.
- Du M, Wang B, Fu X, Yang Q, Zhu MJ. 2015. Fetal programming in meat production. *Meat Science*, 109, 40-47.
- Dwyer CM, Bornett HLI. 2004. Chronic stress in sheep: assessment tools and their use in different management conditions. *Animal Welfare*, 13(3), 293-304.
- Erhard HW, Boissy A, Rae MT, Rhind SM. 2004. Effects of prenatal undernutrition on emotional reactivity and cognitive flexibility in adult sheep. *Behavioural Brain Research*, 151(1-2), 25-35.
- 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.
- Forkman B, Boissy A, Meunier-Salaün MC, Canali E, Jones RB. 2007. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiology&Behavior*, 92(3), 340-374.
- Freitas-de-Melo A, Ungerfeld R. 2022. Impact of Sex Steroids on the Stress Response and Welfare in Female Farm Ruminants. In *Sustainable Agriculture Reviews 57: Animal Biotechnology for Livestock Production 2* (pp. 1-26). Cham: Springer International Publishing.
- Freitas-de-Melo A, Garcia Kako Rodriguez M, Crosa C, Ungerfeld R. 2022. Social stress during the estrus or luteal phase in sheep. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 1-9.
- Freitas-de-Melo A, Ungerfeld R, Orihuela A, Hötzel MJ, Pérez-Clariget R. 2017. Early mother-young relationship and feeding behaviour of lambs are unaffected by low pasture allowance until the beginning of the last third of gestation in single-bearing ewes. *Animal Production Science*, 58(5), 930.
- Freitas-de-Melo A, Ungerfeld R, Hötzel MJ, Orihuela A, Pérez-Clariget R. 2016. Low pasture allowance until late gestation in ewes: behavioural and physiological changes in ewes and lambs from lambing to weaning. *Animal*, 11(2), 285-294.
- Freitas-de-Melo A, Ungerfeld R. 2016. Progesterona y respuesta de estrés: mecanismos de acción y sus repercusiones en rumiantes domésticos. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 7(2), 185-199.
- Freitas-de-Melo A, Ungerfeld R, Hötzel MJ, Abud MJ, Alvarez-Oxiley 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.
- Gardner DS, Tingey K, Van Bon BWM, Ozanne SE, Wilson V, Dandrea J, Keisler DH, Stephenson T, Symonds ME. 2005. Programming of glucose-insulin

- metabolism in adult sheep after maternal undernutrition. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(4), R947-R954.
- Gates DM. 2012. *Biophysical ecology*. Dover Publication. Courier Corporation. New York. pp 382-422
- George LA, Zhang L, Tuersunjiang N, Ma Y, Long NM, Uthlaut AB, Smith DT, Nathanielsz PW, Ford SP. 2012. Early maternal undernutrition programs increased feed intake, altered glucose metabolism and insulin secretion, and liver function in aged female offspring. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 302(7), R795-R804.
- Ghassemi Nejad J, Park KH, Forghani F, Lee HG, Lee JS, Sung KI. 2020. Measuring hair and blood cortisol in sheep and dairy cattle using RIA and ELISA assay: a comparison. *Biological Rhythm Research*, 51(6), 887-897.
- Glazier DS. 2015. Is metabolic rate a universal 'pacemaker' for biological processes? *Biological Reviews*, 90(2), 377-407.
- Godfrey KM, Barker DJ. 2001. Fetal programming and adult health. *Public health nutrition*, 4(2b), 611-624.
- Grandin T, Shivley C. 2015. How farm animals react and perceive stressful situations such as handling, restraint, and transport. *Animals*, 5(4), 1233-1251.
- Gray JA. 1987. *The psychology of fear and stress* (Vol. 5). Cambridge, CUP Archive, 116-136.
- Hall CS. 1936. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *Journal of Comparative Psychology*, 22(3), 345.
- Hall CS. 1934. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18(3), 385.

- Hawkins P, Steyn C, McGarrigle HHG, Saito T, Ozaki T, Stratford LL, Noakes DE, Hanson MA. 1999. Effect of maternal nutrient restriction in early gestation on development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in fetal sheep at 0.8-0.9 of gestation. *Journal of Endocrinology*. 163(3): 553-561.
- Hayward AD, Wilson AJ, Pilkington JG, Pemberton JM, Kruuk LE. 2009. Ageing in a variable habitat: environmental stress affects senescence in parasite resistance in St Kilda Soay sheep. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1672), 3477-3485.
- Hernandez CE, Matthews LR, Oliver MH, Bloomfield FH, Harding JE. 2010. Effects of sex, litter size and periconceptual ewe nutrition on offspring behavioural and physiological response to isolation. *Physiology & Behavior*, 101(5), 588-594.
- Hymczak H, Gołąb A, Mendrala K, Plicner D, Darocha T, Podsiadło P, Hudziak D, Gocol R, Kosiński S. 2021. Core temperature measurement-principles of correct measurement, problems, and complications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(20), 10606.
- Illa M, Eixarch E, Muñoz-Moreno E, Batalle D, Leal-Campanario R, Gruart A, Delgado-García JM, Figueras F, Gratacós E. 2017. Neurodevelopmental effects of undernutrition and placental underperfusion in fetal growth restriction rabbit models. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 42(3), 189-197.
- Ithurralde J, Pérez-Clariget R, Saadoun A, Genovese P, Cabrera C, López Y, Feed O, Bielli A. 2021. Gestational nutrient restriction under extensive grazing conditions: Effects on muscle characteristics and meat quality in heavy lambs. *Meat Science*, 179, 108532.
- Ithurralde J, Genovese P, Abud MJ, 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.

- Ithurralde J, Pérez-Clariget R, Corrales F, Fila D, López-Pérez Á, Marichal MJ, Saadoun A, Bielli A. 2019. Sex-dependent effects of maternal undernutrition on growth performance, carcass characteristics and meat quality of lambs. *Livestock Science*. 221: 105-114.
- Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW. 1992. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *NeuroscienceyBiobehavioralReviews*, 16(2), 115-130.
- Jorge-Smeding E, Perez-Clariget R. 2021. Programación fetal del metabolismo: cambios en el metaboloma plasmático de ovejas adultas. 44º Congreso de la Asociación Argentina de Producción Animal. Modalidad virtual 17-19, 2021.
- Kenyon PR, Blair HT. 2014. Foetal programming in sheep – Effects on production. *Small Rumin. Res*. 118: 16-30.
- Konkel L. 2018. Cortisol: Everything You Need to Know About the 'Stress Hormone'. *Everydayhealth*. [En línea] Disponible en: <https://www.everydayhealth.com/cortisol/guide/>. Fecha del último acceso: 21/08/2023
- Kwon EJ, Kim YJ. 2017. What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. *Obstetrics yGynecology Science*, 60(6), 506-519.
- Liedtke WB. 2017. Deconstructing mammalian thermoregulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(8), 1765-1767.
- Lindsay KL, Buss C, Wadhwa PD, Entringer S. 2019. The interplay between nutrition and stress in pregnancy: implications for fetal programming of brain development. *BiologicalPsychiatry*, 85(2), 135-149.
- LongoS, Bollani L, Decembrino L, Di Comite A, Angelini M, Stronati M. 2013. Short-term and long-term sequelae in intrauterine growth retardation (IUGR). *The Journal of Maternal-Fetal y Neonatal Medicine*, 26(3), 222-225.

- Luz J, Griggio MA, Vieira LV. 2003. Impact of maternal food restriction on cold-induced thermogenesis in the offspring. *Neonatology*, 84(3), 252-258.
- Maggiolo J. 1994. Esquila Tally-hi: una herramienta para conseguir calidad. *Lana Noticias*.
- Mahboub HD, Ramadan SG, Helal MA, Aziz EA. 2013. Effect of maternal feeding in late pregnancy on behaviour and performance of Egyptian goat and sheep and their offspring. *Global Veterinaria*, 11(2), 168-176.
- Manteca X. 2009. Conducta de termorregulación y de alimentación. *Etología veterinaria*. Sant Cugat del Vall: Multimédica Ediciones Veterinarias, 75-110.
- Marciniak A, Patro-Małysza J, Kimber-Trojnar Ż, Marciniak B, Oleszczuk J, Leszczyńska-Gorzela B. 2017. Fetal programming of the metabolic syndrome. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 56(2), 133-138.
- Mizokami T, Wu Li A, El-Kaissi S, Wall JR. 2004. Stress and thyroid autoimmunity. *Thyroid*, 14(12), 1047-1055.
- Montossi F, De Barbieri I, Digiero A, Martínez H, Nolla M, Luzardo S, Mederos A, San Julian R, Zamit J, Frugoni J, Lima G, Costales J. 2005. La esquila preparto temprana: una nueva opción para la mejora reproductiva ovina. Seminario de Actualización técnica: reproducción ovina. Recientes avances realizados por el INIA. Serie de actividades de difusión, 401, 85-103.
- Montossi F, San Julián JP, Zamil W, Levralto J. 1996. Alimentación de la oveja de cría en el último tercio de gestación sobre campo natural y mejoramiento extensivo. INIA Serie Actividades de Difusión.
- Moberg GP. 2000. Biological response to stress: implications for animal welfare. In *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. (pp. 1-21). Wallingford UK: CABI publishing.

- Moberg GP. 1987. A model for assessing the impact of behavioral stress on domestic animals. *Journal of Animal Science*, 65(5), 1228-1235.
- Moran DS, Mendal L. 2002. Core Temperature Measurement. *Sports Medicine*, 32(14), 879-885.
- Moreno JM, Dalmau J. 2001. Alteraciones en la nutrición fetal y efectos a largo plazo: ¿algo más que una hipótesis? *Acta Pediátrica Española*, 59 (10): 50-58.
- Mousa-Balabel TM, Salama MA. 2010. Impact of Shearing Date on Behaviors and Performances of Pregnant Rahmani Ewes. *International Journal of Biological, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* 5: 367-371.
- Namous H, Peñagaricano F, Del Corvo M, Capra E, Thomas DL, Stella A, Williams JL, Ajmone Marsan P, Khatib H. 2018. Integrative analysis of methylomic and transcriptomic data in fetal sheep muscle tissues in response to maternal diet during pregnancy. *BMC genomics*, 19(1), 1-14.
- Narayan E, Parisella S. 2017. Influences of the stress endocrine system on the reproductive endocrine axis in sheep (*Ovis aries*). *Italian Journal of Animal Science*, 16(4), 640-651.
- Nielsen MO, Kongsted AH, Thygesen MP, Strathe AB, Caddy S, Quistorff B, Jørgensen W, Christensen VG, Husted S, Chwalibog A, Sejrsen K, Purup S, Svalastoga E, McEvoy FJ, Johnsen L. 2013. Late gestation undernutrition can predispose for visceral adiposity by altering fat distribution patterns and increasing the preference for a high-fat diet in early postnatal life. *British Journal of Nutrition*, 109(11), 2098-2110.
- Oliver MH, Breier BH, Gluckman PD, Harding JE. 2002. Birth weight rather than maternal nutrition influences glucose tolerance, blood pressure, and IGF-I levels in sheep. *Pediatric Research*, 52(4), 516-524.
- Olmos F. 1997. Efectos climáticos sobre la productividad de pasturas en la región noreste. *Boletín de Divulgación* N.º64. INIA Tacuarembó.

- Parrott RF, Houpt KA, Misson BH. 1988. Modification of the responses of sheep to isolation stress by the use of mirror panels. *Applied Animal Behaviour Science*, 19(3-4), 331-338.
- Pérez-Clariget R, Corrales-Hlinka MF, López-Pérez MB, Jorge-Smeding E. 2023. Nutrient restriction during pregnancy and litter size affect the feeding behaviour, feed preference and welfare of the aged ewe's offspring. *Small Ruminant Research*, 107025.
- Pettersen AK, Marshall DJ, White CR. 2018. Understanding variation in metabolic rate. *Journal of Experimental Biology*, 221(1), jeb166876.
- Piccione G, Caola G, Refinetti R. 2002. Effect of shearing on the core body temperature of three breeds of Mediterranean sheep. *Small Ruminant Research*, 46(2-3), 211-215.
- Rivier C, Rivest S. 1991. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biology of Reproduction*, 45(4), 523-532.
- Roca Fraga FJ, Lagisz M, Nakagawa S, Lopez-Villalobos N, Blair H, Kenyon P. 2018. Meta-analysis of lamb birth weight as influenced by pregnancy nutrition of multiparous ewes. *Journal of Animal Science*. 96: 1962-1977.
- Romanovsky AA. 2018. The thermoregulation system and how it works. *Handbook of clinical neurology*, 156, 3-43.
- Romanovsky AA. 2014. Skin temperature: its role in thermoregulation. *Acta Physiologica*, 210(3), 498-507.
- Romanovsky AA. 2007. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *American journal of Physiology-Regulatory, integrative and comparative Physiology*, 292(1), R37-R46.
- Romero Peñuela MH, Uribe-Velásquez LF, Sánchez Valencia JA. 2011. Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado

- de carne: stress biomarkers as indicators of animal welfare in cattle beef farming. *Biosalud*, 10(1), 71-87.
- Romeyer A, Bouissou MF. 1992. Assessment of fear reactions in domestic sheep, and influence of breed and rearing conditions. *Applied Animal Behaviour Science*, 34(1-2), 93-119.
- Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. 1974. Alcohol, amino acids, and albumin synthesis. *Gastroenterology*, 67(6), 1200-1213.
- Salam RA, Das JK, Bhutta ZA. 2014. Impact of intrauterine growth restriction on long-term health. *Current Opinion in Clinical Nutrition y Metabolic Care*, 17(3), 249-254.
- Sapolsky RM. 2004. Social status and health in humans and other animals. *Annu. Rev. Anthropol.*, 33, 393-418.
- Sarkies P. 2020. Molecular mechanisms of epigenetic inheritance: possible evolutionary implications. In *Seminars in Cell y Developmental Biology* (Vol. 97, pp. 106-115). Academic Press.
- Sartori ED, Sessim AG, Brutti DD, Lopes JF, McManus CM, Barcellos JO. 2020. Fetal programming in sheep: effects on pre-and postnatal development in lambs. *Journal of Animal Science*, 98(9), skaa294.
- Shrestha DC, Acharya S, Gurung DB. 2020. Modeling on metabolic rate and thermoregulation in three layered human skin during carpentering, swimming and marathon. *Applied Mathematics*, 11(08), 753.
- Simonson M, Stephan JK, Hanson HM, Chow BF. 1971. Open field studies in offspring of underfed mother rats. *The Journal of Nutrition*, 101(3), 331-335.
- Stubsj en SM, Bohlin J, Dahl E, Knappe-Poindecker M, Fjeldaas T, Lepschy M, Palme R, Langbein J y Ropstad E. 2015. Assessment of chronic stress in sheep (part I): The use of cortisol and cortisone in hair as non-invasive biological markers. *Small Ruminant Research*, 132, 25-31.

- Tonkiss J, Bonnie KE, Hudson JL, Shultz PL, Duran P, Galler JR. 2003. Ultrasonic call characteristics of rat pups are altered following prenatal malnutrition. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, 43(2), 90-101.
- Tritos NA, Biller BM, Swearingen B. 2011. Management of Cushing disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(5), 279-289.
- Ungerfeld R, Viera MN, Freitas-de-Melo A, Giriboni J, Casuriaga D, Silveira P. 2021. Seasonality of the stress response in goat bucks when there is use of electroejaculation for semen collection. *Animal Reproduction Science*, 226, 106719.
- Ungerfeld R, Freitas-de-Melo A. 2019. Stress and behavioural responses to winter shearing differ between pregnant and non-pregnant ewes. *Physiology & Behavior*, 210, 112653.
- Ungerfeld R, Freitas-de-Melo A, Damián JP, Fernández-Werner A, Kremer R. 2018. Behavioural and physiological changes in pregnant ewes after winter shearing. *Small Ruminant Research*, 169, 57-61.
- Verbeek E, Colditz I, Blache D, Lee C. 2019. Chronic stress influences attentional and judgement bias and the activity of the HPA axis in sheep. *PLoSOne*, 14(1), e0211363.
- Vriens J, Nilius B, Voets T. 2014. Peripheral thermosensation in mammals. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(9), 573-589.
- Watson DL, Gill HS. 1991. Effect of weaning on antibody responses and nematode parasitism in Merino lambs. *Research in Veterinary Science*, 51(2), 128-132.
- Wheeler JL, Reardon TF, Lambourne LJ. 1963. The effect of pasture availability and shearing stress on herbage intake of grazing sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*, 14, 364-372.
- White CR, Kearney MR. 2013. Determinants of inter-specific variation in basal metabolic rate. *Journal of Comparative physiology B*, 183, 1-26.

- Wood CE, Walker CD. 2015. Fetal and neonatal HPA axis. *Comprehensive Physiology*, 6(1), 33-62.
- Yada T, Tort L. 2016. Stress and disease resistance: immune system and immunoendocrine interactions. In *Fish physiology* (Vol. 35, pp. 365-403). Academic Press.
- Yáñez-Pizaña A, de la Cruz-Cruz LA, Tarazona-Morales A, Roldan-Santiago P, Ballesteros-Rodea G, Pineda-Reyes R, Orozco-Gregorio H. 2020. Physiological and behavioral changes of water buffalo in hot and cold systems. *Journal of Buffalo Science*, 9, 110-120.
- Zhu MJ, Ford SP, Nathanielsz PW, Du M. 2004. Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biology of Reproduction*. 71: 1968-1973.
- Zócalo Y, Ungerfeld R, Pérez-Clariget R, Bia, D. 2020. Maternal nutritional restriction during gestation impacts differently on offspring muscular and elastic arteries and is associated with increased carotid resistance and ventricular afterload in maturity. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 11(1), 7-17.