



universidad
de león



TESIS DOCTORAL

Programación metabólica de la eficiencia alimentaria en corderos: efecto de la restricción de alimento en la etapa de lactancia y mecanismos moleculares implicados

Metabolic programming of lamb feed efficiency: effect of feed restriction during the suckling period and molecular mechanisms involved

Alba Santos Baza

Ciencias veterinarias y de los alimentos

Directores: F. Javier Giráldez García
Sonia Andrés Llorente y Carmen Valdés Solís

Tutora: Carmen Valdés Solís

León, 2020

Los doctores Francisco Javier Giráldez García, Sonia Andrés Llorente y Carmen Valdés Solís, como directores de la tesis doctoral titulada “Programación metabólica de la eficiencia alimentaria en corderos: efecto de la restricción de alimento en la etapa de lactancia y mecanismos moleculares implicados” realizada por Alba Santos Baza, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Firmado en León, a 15 de julio de 2020

Francisco Javier Giráldez García

Sonia Andrés Llorente

Carmen Valdés Solís

Memoria presentada por Alba Santos Baza y dirigida por los doctores F. Javier Giráldez García, Sonia Andrés Llorente y Carmen Valdés Solís para optar al grado de Doctor por la Universidad de León, dentro del programa de doctorado “Ciencias veterinarias y de los alimentos”

León, 2020

La autora de esta Tesis Doctoral ha disfrutado de una beca predoctoral del Programa de Formación del Profesorado Universitario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD, FPU15/01630).

Los trabajos que componen esta Tesis Doctoral han sido financiados por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (Proyecto AGL2014-54124R).

Agradecimientos

A mis directores de Tesis, *Sonia, Javier y Carmen*, por su inestimable ayuda, tanto en el terreno académico como personal, por saber guiarme siempre en la dirección correcta y por su enorme esfuerzo y dedicación, realizando su labor de manera impecable.

A mis *padres*, mi mejor referente, por su cariño y apoyo en todas las etapas de mi vida.

A mi marido, *Nico*, por su infinita paciencia y comprensión, aún en los momentos más difíciles.

A mi hijo, *Noah*, por darme la lección de vida más maravillosa.

A todas las demás personas que, de una forma u otra, han hecho posible este trabajo.

A todos ellos, Gracias.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
SUMMARY	10
INTRODUCCIÓN	18
OBJETIVOS	25
DISEÑO EXPERIMENTAL	28
1. Experimento I	30
2. Experimento II	31
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	34
1. Líneas de investigación en Europa: Horizonte 2020	36
2. El sector ovino en España	37
3. Eficiencia alimentaria	40
4. Factores que afectan a la eficiencia alimentaria	44
4.1. Factores genéticos	44
4.2. Factores fisiológicos	45
4.2.1. Ingestión	46
4.2.2. Digestión	48
4.2.3. Metabolismo y composición corporal	50
4.2.4. Actividad física	52
4.2.5. Termorregulación	53
4.2.6. Otros: estado de salud y bienestar animal	55
5. Programación metabólica, epigenética y restricción alimentaria	56
5.1. Herramientas -ómicas y eficiencia de producción	61
5.1.1. Genómica	62
5.1.2. Transcriptómica	63
5.1.3. Proteómica	67
5.1.4. Metabolómica	69
6. Relación entre eficiencia alimentaria y calidad del producto (canal y carne)	72
6.1. Calidad de la canal	73
6.2. Calidad sensorial de la carne	74

6.3. Calidad nutricional de la carne	76
7. Relación entre eficiencia alimentaria y parámetros reproductivos.....	78
CAPÍTULO I	120
CAPÍTULO II	131
CAPÍTULO III	146
CAPÍTULO IV	155
CAPÍTULO V	168
DISCUSIÓN GENERAL	181
CONCLUSIONES	208
CONCLUSIONS	211

LISTA DE ABREVIATURAS

ADG	average daily gain / ganancia media diaria
ADL	<i>ad libitum</i>
AGV	volatile fatty acids / ácidos grasos volátiles
CLA	conjugated linoleic acid / ácido linoleico conjugado
DOHaD	developmental origins of health and disease / origen de la salud y la enfermedad durante el desarrollo
FAME	fatty acid methyl esters / ésteres metílicos de ácidos grasos
GDP	ganancia diaria de peso
GEI	gases de efecto invernadero
IC	índice de conversión
IMS	ingestión de materia seca
LH	luteinizing hormone / hormona luteinizante
LL	<i>longissimus lumborum</i>
LT	<i>longissimus thoracis</i>
LTL	<i>longissimus thoracis et lumborum</i>
MBW	mid-test metabolic body weight / peso metabólico medio
MDA	malondialdehyde / malondialdehído
MS	materia seca
MUFA	monounsaturated fatty acids / ácidos grasos monoinsaturados

NEFA	non-sterified fatty acids / ácidos grasos no esterificados
NGS	next generation sequencing / secuenciación masiva o de nueva generación
PCR	polymerase chain reaction / reacción en cadena de la polimerasa
PFG	producción final ganadera
PUFA	polyunsaturated fatty acids / ácidos grasos poliinsaturados
PV	peso vivo
RES	restricted / restringido
RFI	residual feed intake / consumo residual de alimento
RG	residual body weight gain / ganancia residual de peso
RGR	relative growth rate / tasa de crecimiento relativo
RIG	residual intake and body weight gain / ingesta y ganancia de peso residuales
ROS	reactive oxygen species / especies reactivas de oxígeno
SFA	saturated fatty acids / ácidos grasos saturados
SOD	superoxide dismutase / superóxido dismutasa
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances / especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

RESUMEN

Las perspectivas de crecimiento de la población mundial y el aumento de la demanda de productos de origen animal plantean un escenario futuro de incremento en la competencia por los recursos entre el hombre y el ganado, que ha propiciado la búsqueda de nuevas estrategias productivas para aumentar la eficiencia alimentaria de los animales de abasto.

El incremento de la eficiencia alimentaria, no obstante, podría comprometer otros parámetros como el ritmo de crecimiento, la calidad de la canal y de la carne, así como la salud y el bienestar animal. Por ello, es indispensable conocer los factores y mecanismos moleculares que determinan las diferencias individuales en la eficiencia con que usan los recursos nutritivos, pero con un enfoque holístico, que integre los diferentes objetivos que demanda la sociedad: eficiencia, salud y bienestar animal, calidad de los productos e impacto ambiental.

Uno de los factores clave en la eficiencia alimentaria es la nutrición recibida por el animal en las primeras etapas de vida (nutrición pre y posnatal), ya que puede provocar cambios a largo plazo en la expresión génica en diferentes órganos y tejidos y, en consecuencia, en el metabolismo en la etapa adulta.

Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados sobre programación metabólica se han planteado desde la perspectiva de la salud, evaluando el efecto sobre la incidencia de patologías metabólicas en la etapa adulta. La relación con la eficiencia alimentaria ha sido objeto de menos estudio, especialmente en las especies rumiantes. Además, gran parte de las investigaciones se han centrado en el efecto de la restricción de alimento en el periodo prenatal, existiendo pocos estudios acerca del efecto de la restricción en las primeras etapas de vida (durante la lactancia).

La programación metabólica brinda la posibilidad de diseñar intervenciones nutricionales tempranas que permitan modular la eficiencia alimentaria y la productividad animal en etapas posteriores de la vida. Resulta, por tanto, necesario identificar los factores (edad, tipo de restricción, duración de la restricción, etc.) y los mecanismos moleculares involucrados si se desea diseñar estrategias eficaces.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, se planteó el presente trabajo de investigación cuyo objetivo general ha sido estudiar el efecto de una restricción moderada de alimento durante la lactancia sobre la eficiencia alimentaria de corderos en la etapa

posdestete (cebo y recría), así como los mecanismos moleculares subyacentes que intervienen en el proceso.

Para abordar este objetivo, se realizaron diferentes pruebas experimentales, cuyos resultados se publicaron en 5 artículos científicos, que se corresponden con los 5 capítulos en los que se divide la memoria.

En el **capítulo I**, que se corresponde con el artículo titulado “*Feed efficiency and the liver proteome of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period*”, se describe el estudio del efecto de una restricción moderada durante la lactancia sobre la eficiencia alimentaria en la fase posterior de cebo, así como el efecto sobre el perfil proteómico del hígado, la microbiota ruminal y los parámetros de fermentación gastrointestinal. Para ello, se utilizaron 24 corderos machos recién nacidos de raza merina con un peso vivo inicial de $4,81 \pm 0,256$ kg, que se distribuyeron en dos grupos experimentales de 12 animales cada uno (ADL: grupo *ad libitum*; RES: grupo restringido). Durante la lactancia, los animales del grupo ADL permanecieron 24 horas al día con las madres mientras que los del grupo RES permanecieron separados de sus madres durante 9 horas, las cuales se ordeñaron todos los días una hora antes de reunirse con los corderos para asegurar la restricción de alimento. Los animales se pesaron al nacimiento y dos veces a la semana durante todo el experimento. Cuando alcanzaron los 13,5 kg de peso, todos los animales se sometieron a un destete progresivo (ración completa granulada, paja y alfalfa a voluntad). Los animales se destetaron definitivamente a los 15 kg de peso, se alojaron en jaulas individuales y se alimentaron con la misma ración completa granulada administrada de forma restringida en función del peso (35 g/kg de peso vivo al día). Diariamente se controló la ingestión de alimento y semanalmente el peso. En torno a los 20 kg de peso, se estimó la digestibilidad de ambos grupos.

Todos los corderos se sacrificaron cuando alcanzaron los 27 kg de peso vivo. Tras el sacrificio, se registró el peso de los órganos y se recogieron muestras de hígado para determinar el contenido de grasa y evaluar el perfil proteómico. Además, se tomaron muestras de contenido ruminal e intestinal para caracterizar la microbiota presente y su interacción con los parámetros de fermentación a este nivel (ácidos grasos volátiles, láctico y amoníaco), así como el perfil de ácidos grasos del contenido ruminal. Por último, se tomaron muestras de intestino para determinar la longitud de las vellosidades a nivel del íleon a través del estudio histológico.

Los corderos del grupo RES presentaron una peor eficiencia alimentaria durante el periodo de cebo en comparación al grupo ADL (índice de conversión; 3,69 vs. 3,05; $P < 0,001$). No se observaron diferencias en la microbiota ruminal, en los parámetros de fermentación gastrointestinal ni en la digestibilidad aparente. Sin embargo, el tamaño del corazón fue mayor en los animales RES ($P < 0,05$) y la proporción del intestino delgado respecto al peso total del intestino fue más baja en estos animales ($P < 0,05$). Además, se encontró una mayor cantidad de grasa en el hígado de los animales RES ($P < 0,05$), así como mayores cantidades de grasa omental ($P < 0,10$) y perirrenal ($P < 0,01$), mientras que la cantidad de grasa mesentérica ($P < 0,05$) fue menor en este grupo. Respecto al estudio histológico, la longitud de las vellosidades del íleon fue menor en el grupo RES ($P < 0,05$). Por otro lado, el perfil proteómico ($P < 0,05$) indicó un mayor catabolismo de proteínas (p. ej., mayor acumulación de la enzima dihidrolipoil deshidrogenasa) y una reducción de la síntesis de proteínas (p. ej., menor acumulación de la enzima guanidinoacetato N-metiltransferasa) y la β -oxidación de ácidos grasos (p. ej., menor acumulación de la enzima enoil-CoA hidratasa, mitocondrial) en los animales RES. También se observó una menor acumulación de proteínas relacionadas con la detoxificación (p. ej., glutatión-S-transferasa, microsomal) y las defensas antioxidantes (p. ej., superóxido dismutasa [Cu–Zn] isoforma X2, superóxido dismutasa [Mn] mitocondrial).

En el estudio descrito en el **capítulo II** (artículo titulado “*Liver transcriptomic and plasma metabolomic profiles of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period*”) se utilizaron los mismos animales y dietas descritas en el capítulo anterior, y se presentan los resultados correspondientes al perfil transcriptómico del hígado y el perfil metabolómico plasmático de los corderos al finalizar la fase de cebo. Para ello, se realizó un sangrado días antes del sacrificio (a los 25 kg PV) para estudiar el perfil metabolómico del plasma. Tras el sacrificio se recogieron muestras de hígado para evaluar la expresión génica.

La restricción de alimento durante la lactancia de corderos provocó cambios en el perfil transcriptómico hepático y en el perfil metabolómico plasmático ($P < 0,10$) durante el periodo de cebo. Se observó una menor expresión en el grupo RES de genes implicados en la síntesis de proteínas (p. ej., *RPLP1*, *RPL3*), así como una mayor expresión de genes relacionados con la degradación proteolítica (p. ej. *DNAJ1*), sugiriendo un mayor catabolismo de proteínas en estos animales. Por el contrario, los genes relacionados con la β -oxidación de ácidos grasos (p. ej., *ACSM3*, *ACOT13*, *ND3*) mostraron una menor

expresión en el grupo RES. Además, el grupo RES mostró una mayor expresión de genes implicados en el metabolismo de los xenobióticos (p. ej., *CYP3A24*, *CYP2C19*) y una menor expresión de genes implicados en la protección frente al estrés oxidativo (p. ej., *C1H21orf3*). En concordancia con estos resultados, el perfil metabolómico del plasma indicó una mayor acumulación en los animales RES de metabolitos lipídicos [p. ej., MG(0:0/14:0/0:0), DG(16:0/16:0/0:0)] y una menor acumulación de calpeptina (inhibidor de la proteasa calpaína). También se observaron diferencias entre ambos grupos en varios metabolitos relacionados con la inflamación (p. ej., esfingolípidos) y el metabolismo de xenobióticos (p. ej., alcaloides, flavonoides y terpenos).

El **capítulo III** se corresponde con el artículo titulado “*Programming Merino lambs by early feed restriction reduces growth rates and increases fat accretion during the fattening period with no effect on meat quality traits*”, cuyo objetivo fue evaluar el efecto de la restricción alimentaria durante la lactancia de los animales estudiados en la prueba previa sobre las características de la calidad de la canal y de la carne tras el sacrificio (rendimiento comercial, pH, evolución del color, peroxidación lipídica [TBARS], textura, pérdidas por cocinado, análisis de composición química, perfil de ácidos grasos, estudio histológico, etc.)

No se observaron diferencias en el rendimiento comercial, evolución del color de la grasa subcutánea y de la carne ($P > 0,05$), TBARS, textura, pérdidas por cocinado, compuestos volátiles y el número y diámetro de fibras musculares ($P > 0,10$). En cambio, se encontró una tendencia hacia una mayor cantidad de grasa intramuscular en los corderos del grupo RES ($P < 0,10$). La carne procedente de los animales del grupo RES presentó una mayor cantidad de ácidos grasos saturados totales (SFA, $P < 0,01$) y monoinsaturados (MUFA, $P < 0,05$), no encontrándose diferencias entre ambos grupos experimentales en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, $P > 0,05$).

En el **capítulo IV** (artículo titulado “*Liver transcriptomic and proteomic profiles of suckling lambs are modified by feed restriction during the suckling period*”) se estudió el efecto del diferente nivel de alimentación durante la lactancia sobre el perfil transcriptómico y proteómico del hígado de corderas sacrificadas durante esta fase. Para ello, se utilizaron 40 corderas recién nacidas de raza assaf, con un peso vivo inicial de $4,73 \pm 0,116$ kg. Los animales se dividieron en dos grupos experimentales de 20 corderas cada uno y se alojaron en jaulas individuales durante la lactancia. El primer grupo se alimentó *ad libitum* (ADL) para alcanzar una ganancia de peso de unos 250 g/día,

mientras que el segundo (restringido, RES) recibió cantidades restringidas de lactorreemplazante (aproximadamente el 62,5% de la cantidad de lactorreemplazante administrada al grupo ADL) para crecer a un ritmo medio de 120 g/día. Los animales se pesaron al nacimiento y dos veces a la semana durante todo el experimento. Durante este periodo, se sacrificaron 8 animales representativos de cada grupo a la misma edad, aproximadamente a los 35 días de vida. Para la toma de muestras *post mortem* se siguió un procedimiento similar al Exp. 1, exceptuando las características de la calidad de la canal y de la carne, y los parámetros de diversidad microbiana y fermentación ruminal.

La alimentación restringida durante la lactancia artificial provocó cambios en la expresión génica y proteómica a nivel del hígado ($P < 0,05$) durante el periodo de restricción. Se detectó una mayor expresión en el grupo RES de genes implicados en la β -oxidación de ácidos grasos (p. ej., *ECII*, *ECHS1*), así como una mayor acumulación de proteínas relacionadas con este proceso (p. ej., 3-cetoacil-CoA tiolasa, isoforma X2, peroxisomal). Además, se observó una mayor expresión en los corderos RES de genes que participan en la síntesis de proteínas (p. ej., *RPL22L1*), así como diferencias entre ambos grupos en la expresión de genes implicados en el catabolismo de aminoácidos (p. ej., *AGXT2*, *ACMSD*). Estos resultados concuerdan con la mayor acumulación en el grupo RES de enzimas implicadas en el catabolismo proteico (p. ej., proteína de unión al selenio 1, isoforma X1) y la degradación de aminoácidos (p. ej., aminometiltransferasa, isoforma X2 mitocondrial). Asimismo, se observó una menor expresión en el grupo RES de genes que participan en el ciclo de la urea (p. ej., *CPS1*, *OAT*, *ARG1*). Por otro lado, se encontró un aumento de la expresión en los animales RES de genes que participan en el metabolismo de xenobióticos (p. ej., *UGT1A6*, *CYP2C19*, *GSTAI-1*), la inflamación (p. ej., *MGST1*), el estrés oxidativo (p. ej., *SOD1*) y la apoptosis (p. ej., *PERP*). En consonancia, el perfil proteómico también indicó una mayor acumulación de la enzima peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa A, relacionada con la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo. Además, los corderos RES presentaron una menor expresión de varios genes relacionados con la función reproductiva (p. ej., *STS*, *SPR*).

En el **capítulo V**, que se corresponde con el artículo titulado “*Milk replacer restriction during early life impairs the live body weight and progesterone patterns of ewe lambs during the replacement period*” se utilizaron los mismos animales y tratamientos descritos en el capítulo anterior, y se describe el efecto de la restricción de alimento durante la lactancia sobre la eficiencia alimentaria en la fase posdestete de cría

y el establecimiento de la pubertad. Después del sacrificio, se registró el peso de los diferentes órganos y se tomaron muestras de íleon para determinar la longitud de las vellosidades intestinales. También se tomaron muestras de hígado para determinar el contenido de grasa y cuantificar las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Las corderas que no se sacrificaron, se sometieron a un destete progresivo cuando alcanzaron los 13,5 kg de peso (en el caso del grupo ADL) o los 11,5 kg de peso (grupo RES). Desde ese momento, todos los animales se trasladaron a un recinto común y se alimentaron *ad libitum* durante 42 días con pienso de arranque, paja de cebada y alfalfa. Transcurrido este periodo, las corderas se alimentaron *ad libitum* con la misma ración completa hasta el final del experimento. Para establecer el momento de la pubertad, se determinó semanalmente el nivel de progesterona sérica. Además, se realizaron estudios de metabólica en el plasma, se estimó la digestibilidad (a los 8 meses de edad, aproximadamente) y se llevó a cabo un control diario de ingestión durante parte del periodo de recría para calcular el consumo residual de alimento (RFI) como medida de eficiencia alimentaria. Durante este periodo, los animales se pesaron una vez a la semana.

La ingestión restringida de lactorreemplazante no promovió diferencias en la eficiencia alimentaria (RFI, $P > 0,10$) ni en la digestibilidad aparente ($P > 0,10$) durante el periodo posdestete de recría, si bien los animales del grupo RES presentaron una tendencia a un menor peso vivo al final del experimento ($P < 0,10$). El perfil metabólico realizado durante la fase de recría indicó una mayor acumulación en el grupo RES de compuestos derivados del metabolismo de lípidos [p. ej., PI (15:0/14:0), PPA (16:0/18:1(9Z))] y proteínas (p. ej., 2-oxoarginina, Ne-metil-L-lisina, Thr Phe Arg), así como metabolitos relacionados con la detoxificación de xenobióticos (p. ej., alcaloides, flavonoides y triterpenos), la inflamación y la función reproductiva (p. ej., prostaglandina E2 [PGE₂]-biotina), y la apoptosis [p. ej., PS (17:1(9Z)/0:0)]. Los niveles de progesterona sérica mostraron que solo una cordera del grupo RES (235 d), frente a 4 del grupo ADL ($194 \pm 36,1$ d), ovularon por primera vez. Respecto a los animales sacrificados, no se observaron diferencias entre ambos grupos en el peso de las vísceras ($P > 0,05$), pero los corderos RES sacrificados presentaron una mayor proporción del retículo-rumen respecto al tracto digestivo ($P < 0,05$), así como una tendencia a una menor longitud de las vellosidades del íleon ($P < 0,10$). Además, el grupo RES mostró una menor proporción de grasa omental y una mayor proporción de grasa mesentérica ($P < 0,001$). No se

encontraron diferencias en el contenido de grasa del hígado ni en los valores de TBARS ($P>0,10$).

Considerando todos los resultados del trabajo de investigación, se puede concluir que la restricción de alimento durante la lactancia de corderos provoca cambios en el metabolismo lipídico y proteico que perjudican a corto plazo (cebo) la eficiencia alimentaria y a corto y medio plazo (cebo y recría) la ganancia de peso. La restricción alimentaria durante la lactancia también promueve a corto plazo (cebo) una mayor acumulación de grasa en los corderos y altera la composición química y el perfil de ácidos grasos de la carne, si bien el resto de parámetros relacionados con la calidad de la canal y de la carne no se ven afectados. Por último, la restricción de lactorreemplazante de corderas provoca un retraso en el establecimiento de la pubertad en el periodo de recría, asociado con el menor crecimiento de estos animales.

SUMMARY

The prospects for world population growth and the increased demand for animal products bring on a future scenario of increased competition for resources between man and livestock, which has led to the search for new production strategies to increase feed efficiency of farm animals.

However, increased feed efficiency could compromise other traits such as growth rate, carcass and meat quality, as well as animal health and welfare. Therefore, it is essential to know the molecular factors and mechanisms that determine individual differences in the efficiency of feed resources use, but with a holistic approach that integrates the different objectives that society demands: feed efficiency, animal health and welfare, quality of products and environmental impact.

One of the key factors in feed efficiency is the nutrition received by the animal during the early stages of life (pre and postnatal nutrition), since it can cause long-term changes in gene expression in different organs and tissues and, consequently, in the metabolism during the adult stage.

Nevertheless, most of the studies carried out on metabolic programming have been raised from a health perspective, evaluating the effect on the incidence of metabolic pathologies during the adult stage. The relation with feed efficiency has been studied hardly, especially in ruminant species. Furthermore, much of the research has focused on the effect of feed restriction during the prenatal period, with few studies on the effect of restriction during the early stages of life (during the suckling period).

Metabolic programming offers the possibility of designing early nutritional interventions that allow modulating feed efficiency and animal productivity during later stages of life. Therefore, it is necessary to identify the factors (age, type of restriction, duration of the restriction, etc.) and the molecular mechanisms involved to design effective strategies.

For all these reasons, the present studies were raised with the overall objective of studying the effect of a moderated feed restriction during the suckling period on feed efficiency of lambs during postweaning phases (fattening and replacement), as well as the underlying molecular mechanisms involved in the process.

To achieve this objective, different experimental trials were carried out, whose results were published in 5 scientific articles, corresponding to the 5 chapters of this dissertation.

Chapter I corresponds to the article entitled “*Feed efficiency and the liver proteome of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period*”, which describes the study of the effect of a moderated feed restriction during the suckling period on feed efficiency during the fattening period, as well as the effect on liver proteomic profile, ruminal microbiota and gastrointestinal fermentation parameters. For this purpose, 24 merino male newborn lambs with an initial live body weight (LBW) of 4.81 ± 0.256 kg were used, and were assigned to one of two experimental groups (12 animals per group; ADL: *ad libitum* group; RES: restricted group). During the suckling period, ADL lambs were kept permanently with the dams, whereas the RES lambs were separated from the dams during 9 hours, which were milked one hour every day before meeting with the lambs to ensure feed restriction. All the lambs were weighed at birth and twice a week throughout all the experiment. When lambs reached individual LBW of 13.5 kg they were weaned progressively (free access to a complete pelleted diet, straw, and alfalfa) until reaching 15 kg. Animals were then penned individually and offered the same complete pelleted diet at a restricted level (35 g/kg LBW per day). Feed intake was controlled daily and weight was recorded weekly. Around 20 kg of weight, the digestibility of both groups was estimated.

All lambs were slaughtered when they reached 27 kg of LBW. The weight of different organs was recorded and liver samples were taken to evaluate fat content and proteomic profile. In addition, samples of ruminal and intestinal content were taken to characterize the microbiota and its interaction with the fermentation parameters at this level (volatile fatty acids, lactic acid, and ammonia), as well as the fatty acid profile of the ruminal content. Finally, intestine samples were taken to determine the ileum villi height through the histological examination.

The RES lambs showed poorer feed efficiency during the fattening period when compared with the ADL group (feed conversion rate; 3.69 vs. 3.05; $P < 0.001$). No differences were observed in ruminal microbiota, gastrointestinal fermentation parameters or apparent digestibility. However, the heart was greater in RES compared with ADL animals ($P < 0.05$) and the small intestine represented a smaller fraction of the total intestine in RES lambs compared with ADL lambs ($P < 0.05$). In addition, a greater

amount of fat was found in the liver of RES compared with ADL animals ($P<0.05$), as well as greater amounts of omental ($P<0.10$) and perirenal fat ($P<0.01$), whereas the amount of mesenteric fat ($P<0.05$) was lower in this group. Regarding the histological examination, the average ileum villi height was shorter in RES compared with ADL group ($P<0.05$). On the other hand, proteomic profile ($P<0.05$) showed a higher catabolism of proteins (e.g., over-accumulation of the enzyme dihydrolipoyl dehydrogenase) and a reduction in protein synthesis (e.g., down-accumulation of the enzyme guanidinoacetate N-methyltransferase) and β -oxidation of fatty acids (e.g., down-accumulation of the enzyme enoyl-CoA hydratase, mitochondrial) in RES lambs when compared with the ADL animals. A down-accumulation of proteins related to detoxification (e.g., glutathione-S-transferase, microsomal) and antioxidant defenses (e.g., superoxide dismutase [Cu-Zn] isoform X2, superoxide dismutase [Mn] mitochondrial) were also observed.

In **chapter II** (article entitled “*Liver transcriptomic and plasma metabolomic profiles of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period*”), the experimental animals and diets were the same mentioned in the previous chapter. The results corresponding to the liver transcriptomic profile and the plasma metabolomic profile of lambs at the end of fattening period are presented. To do this, blood samples were collected from all of the animal some days before slaughter (at 25 kg of LBW) to study the plasma metabolomic profile. After slaughter, liver samples were taken to assess gene expression.

Feed restriction during the suckling period of lambs promoted changes in hepatic transcriptomic profile and plasma metabolomic profile ($P<0.10$) during the fattening period. RES group showed down-expression of genes involved in protein synthesis (e.g., *RPLP1*, *RPL3*), as well as over-expression of genes related to proteolytic degradation (e.g., *DNAJ1*), thus suggesting a higher catabolism of protein in these animals. In contrast, genes related to β -oxidation of fatty acids (e.g., *ACSM3*, *ACOT13*, *ND3*) were down-regulated in the RES group. Furthermore, the RES group showed a higher expression of genes involved in xenobiotics metabolism (e.g., *CYP3A24*, *CYP2C19*) and a lower expression of genes involved in protection against oxidative stress (e.g., *C1H21orf3*). According to these results, plasma metabolomic profile indicated increased accumulation in RES animals of lipid metabolites [e.g., MG(0:0/14:0/0:0), DG(16:0/16:0/0:0)] and less accumulation of calpeptin (calpain protease inhibitor).

Differences between the two groups were also observed in various metabolites related to inflammation (e.g., sphingolipids) and xenobiotic metabolism (e.g., alkaloids, flavonoids, and terpenes).

Chapter III corresponds to the article entitled “*Programming Merino lambs by early feed restriction reduces growth rates and increases fat accretion during the fattening period with no effect on meat quality traits*”, whose objective was to evaluate the effect of feed restriction during the suckling period of animals studied in previous trial on carcass and meat quality traits after the slaughter (carcass yield, pH, colour evolution, lipid peroxidation [TBARS], texture, cooking losses, chemical composition analysis, fatty acid profile, histological examination, etc.)

No differences were observed in carcass yield, color evolution of subcutaneous fat and meat ($P>0.05$), TBARS, texture, cooking losses, volatile compounds, or fiber area and number of muscle fibers ($P>0.10$). In contrast, a trend towards a greater intramuscular fat accretion was found in RES lambs ($P<0.10$). The meat from RES animals presented a greater amount of total saturated fatty acids (SFA, $P<0.01$) and monounsaturated (MUFA, $P<0.05$), finding no differences between both experimental groups in the content of polyunsaturated fatty acids (PUFA, $P>0.05$).

In **chapter IV** (article entitled “*Liver transcriptomic and proteomic profiles of suckling lambs are modified by feed restriction during the suckling period*”) the effect of different feeding level during the suckling period on the liver transcriptomic and proteomic profile of lambs slaughtered during this phase was studied. For this purpose, 40 assaf female newborn lambs were used, with an initial LBW of 4.73 ± 0.116 kg. Animals were assigned to one of two experimental groups (20 lambs per group) and were penned individually during the suckling period. The first group of lambs was fed milk replacer (MR) *ad libitum* (ADL) to gain a maximum of 250 g/d), whereas the second group (restricted; RES) only received approximately 62.5% of MR intake as the ADL group, to gain 100-120 g/d. The animals were weighed at birth and twice a week throughout all the experiment. During this period, 8 representative animals from each group were slaughtered at the same age, approximately at 35 days-old. For the post-mortem sampling, a procedure similar to Exp. 1 was followed, except for the carcass and meat quality traits, and the ruminal microbial diversity and fermentation parameters.

Milk replacer restriction during the artificial rearing period induced changes in gene and proteomic expression at the hepatic level ($P < 0.05$) during the feed restriction period. The expression of genes involved in β -oxidation of fatty acids (e.g., *ECII*, *ECHS1*) was increased in the RES group, which is consistent with the over-accumulation of proteins related to this process in these animals (e.g., 3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal isoform X2). Furthermore, the expression of genes implicated in protein synthesis (e.g., *RPL22L1*) was up-regulated in RES lambs, and the expression of genes involved in the aminoacid catabolism was also modified in this group (e.g., *AGXT2*, *ACMSD*). These results match those observed in the liver proteome profile, with the over-accumulation in the RES group of enzymes involved in protein catabolism (e.g., selenium-binding protein 1 isoform X1) and aminoacid degradation (e.g., aminomethyltransferase, mitochondrial isoform X2). Moreover, the expression of genes encoding enzymes involved in urea cycle (e.g., *CPS1*, *OAT* and *ARG1*) was down-regulated in the RES lambs. On the other hand, other genes related to xenobiotic metabolism (e.g., *UGT1A6*, *CYP2C19*, *GSTA1-1*), inflammation (e.g., *MGST1*), oxidative stress (e.g., *SOD1*) and apoptosis (e.g., *PERP*) were up-regulated in the RES animals. Accordingly, the proteomic profile also indicated an over-accumulation of the enzyme peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase A, related to the inflammatory response and oxidative stress. Furthermore, various genes related to reproductive function (e.g., *STS*, *SPR*) were down-regulated in the RES lambs.

In **Chapter V**, which corresponds to the article entitled “*Milk replacer restriction during early life impairs the live body weight and progesterone patterns of ewe lambs during the replacement period*”, the experimental animals and diets were the same mentioned in the previous chapter, and describes the effect of feed restriction during the suckling period on feed efficiency during the postweaning replacement period and on puberty onset. After slaughter, the weight of different organs was recorded and ileum samples were taken in order to determine intestinal villi height. Liver samples were also taken to determine fat content and to quantify thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The non-slaughtered ewe lambs were weaned progressively when they reached 13.5 kg of LBW (ADL group) or 11.5 kg (RES group). Since then, all the animals were moved to a single feedlot where they stayed during 42 days, being fed *ad libitum* the same starter feed, barley straw, and alfalfa. After this period, the ewe lambs were fed *ad libitum* the same total mixed ration (TMR) until the end of the experiment. Serum progesterone

level was determined weekly in order to establish puberty onset. In addition, plasma metabolomics analysis was performed, digestibility was estimated (at approximately 8 months-old) and the daily intake of TMR was measured individually during part of the replacement period to calculate the residual feed intake (RFI) as a measure of feed efficiency. During this period, animals were weighed once a week.

Milk replacer restriction during early life did not promote differences in feed efficiency (RFI, $P>0.10$) or apparent digestibility ($P>0.10$) during the postweaning replacement period, although RES animals showed a trend towards a lower LBW at the end of the experiment ($P<0.10$). Metabolomic profile obtained during the replacement period indicated an over-accumulation in the RES group of compounds derived from lipid [e.g., PI (15:0/14:0), PPA (16:0/18:1(9Z))] and protein metabolism (e.g., 2-oxoarginine, Ne-methyl-L-lysine, Thr Phe Arg), as well as metabolites related to xenobiotic detoxification (e.g., alkaloids, flavonoids and triterpenes), inflammation and reproductive function (e.g., prostaglandin E2 [PGE₂]-biotin), and apoptosis [e.g., PS (17:1(9Z)/0:0)]. Serum progesterone levels revealed that only 1 RES (235 d) versus 4 ADL ewe lambs ($194 \pm 36,1$ d) had ovulated for the first time at the end of the experiment. Regarding the slaughtered animals, no differences were observed between both groups in the visceral organ weight ($P>0.05$), but the proportion of reticulorumen was increased in the slaughtered RES lambs when calculated as percentage of the empty digestive tract (EDT) ($P<0.05$). RES lambs also showed a trend to a shorter ileum villi length ($P<0.10$) compared with ADL lambs. Furthermore, the RES group presented a lower proportion of omental fat and a higher proportion of mesenteric fat ($P<0.001$) compared with ADL group. No differences were found in liver fat content or in TBARS values ($P>0.10$).

Overall, we may conclude that feed restriction during the suckling period of lambs promotes changes in lipid and protein metabolism that impair short-term (fattening) feed efficiency and weight gain in the short and medium term (fattening and replacement). Feed restriction during the suckling period also promotes in the short term (fattening) a greater fat accretion in lambs and alters meat chemical composition and fatty acid profile. Nevertheless, the rest of carcass and meat quality traits are not affected. Finally, milk replacer restriction in female lambs causes a delay of puberty onset during the replacement period, associated with the slower growth of these animals.

INTRODUCCIÓN

Según un informe elaborado por la Organización de las Naciones Unidas (United Nations, 2019), se estima que la población mundial alcanzará los 9.700 millones de personas en el año 2050 y los 10.900 millones en 2100, aproximadamente. A este rápido crecimiento, se le suma el aumento de la demanda de productos de origen animal, directamente correlacionado con el incremento del nivel de vida de la población en los últimos años, en especial en los países en vías de desarrollo (FAO, 2009; Friedrich, 2014).

Por ello, uno de los grandes retos a los que se enfrenta la humanidad es alimentar a una población creciente con los recursos limitados de los que dispone la Tierra. Esto ha propiciado la búsqueda de nuevas estrategias productivas para abastecer a todo el planeta aumentando la eficiencia con que los animales utilizan los recursos nutritivos y, reduciendo, por tanto, la cantidad de alimento necesaria para producir una unidad de producto animal.

En consecuencia, el incremento de la eficiencia alimentaria, además de reducir la competencia por los recursos, también contribuirá a mejorar la rentabilidad de la actividad ganadera, ya que es bien sabido que el coste de los alimentos representa uno de los factores más importantes en la economía de la producción animal, llegando a alcanzar el 60-80% del coste total de las explotaciones animales (Cammack *et al.*, 2005; Montanholi *et al.*, 2008).

No obstante, es importante señalar que el desarrollo de estrategias orientadas a maximizar la eficiencia no debe ignorar objetivos complementarios relacionados con el bienestar animal, el impacto ambiental de la actividad ganadera y las propiedades organolépticas, nutritivas y saludables de los alimentos producidos.

En este sentido, en los últimos años, la preocupación del consumidor por el bienestar y respeto por los derechos de los animales de granja ha obligado a cambiar ciertas estrategias de los sistemas de producción animal con el fin de conseguir la aceptación social de este sector alimentario. Además, desde el punto de vista de la rentabilidad económica de las explotaciones, la salud y el bienestar de los animales están directamente correlacionados con la eficiencia alimentaria, siendo la alimentación uno de los factores que conecta estos tres vértices de la producción animal. De hecho, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) ha estimado que el 20% de la producción animal se pierde debido a la existencia de animales no saludables/enfermos.

Por ejemplo, está ampliamente demostrado que la presentación de acidosis ruminal provoca alteraciones en la microbiota ruminal y, por tanto, afecta el bienestar y el rendimiento productivo de los animales, al disminuir la eficiencia ruminal (Khiaosa-ard y Zebeli, 2014). Así, en los sistemas intensivos de cebo de corderos, la alimentación juega un papel muy importante para reducir al mínimo la incidencia de patologías relacionadas con la nutrición (Min *et al.*, 2003; Morán *et al.*, 2012; Morán *et al.*, 2013).

Asimismo, hoy día, por ejemplo, en la decisión de compra del consumidor de carne intervienen múltiples factores, entre los que destacan aquellos relacionados con las propiedades organolépticas, la calidad nutricional y el impacto en la salud del consumidor (p. ej., contenido en grasas saturadas) (FAO, 2009; Friedrich, 2014; Listrat *et al.*, 2016). En este sentido, por ejemplo, existe una relación entre el consumo de carne roja y la propensión a padecer patologías cardiovasculares (Micha *et al.*, 2010), sobre todo con la carne de rumiantes, considerada menos cardiosaludable que las denominadas carnes blancas debido a su perfil de ácidos grasos y el mayor contenido en colesterol (Fernández-Ginés *et al.*, 2005; Wood *et al.*, 2008).

Por otra parte, el creciente interés de los consumidores por la protección y cuidado del medio ambiente ha impulsado numerosas investigaciones para intentar reducir el impacto ambiental de la producción animal. El sector agrícola y ganadero tiene una alta participación en la problemática del cambio climático del planeta, principalmente por la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) (Gerber *et al.*, 2013; FAO, 2016; Makkar, 2016). En este sentido, se estima que el sector ganadero a nivel mundial es responsable del 14,5% de las emisiones de GEI, del 44% de las emisiones de metano (CH₄) y del 53% de las emisiones de óxido nitroso (N₂O), y emite el 5% del total de dióxido de carbono (CO₂) (Gerber *et al.*, 2013).

Por todo ello, cualquier estrategia productiva encaminada a aumentar la eficiencia de las explotaciones ganaderas deberá tener en cuenta también estos aspectos. Entre las potenciales estrategias productivas ha despertado un gran interés científico y técnico aquellas relacionadas con la alimentación en el periodo prenatal y en las primeras etapas de la vida, ya que provoca cambios permanentes en la fisiología y el metabolismo del organismo, lo que se conoce como “programación metabólica o programación del desarrollo” (Barker *et al.*, 1993a,b; Barker, 1995a,b). Conocer las bases fisiológicas y moleculares involucradas en este proceso adaptativo será clave para

desarrollar estrategias que permitan potenciar o atenuar los efectos, según el objetivo perseguido.

En condiciones reales, es frecuente que el consumo de leche por los corderos en las primeras semanas de vida varíe como consecuencia de diversos factores ambientales, de manejo o de salud, como el sistema de lactancia, vitalidad del cordero, alimentación de las madres, problemas en la ubre de la oveja, baja producción de leche, etc. Así, la restricción temprana podría programar la fisiología y metabolismo de los animales, influyendo en la eficiencia alimentaria en etapas posteriores.

Referencias

- BARKER, D.J.P. 1995a. Intrauterine programming of adult disease. *Molecular Medicine Today* 1, 418-423.
- BARKER, D.J.P. 1995b. Fetal origins of coronary heart disease. *British Medical Journal* 311, 171-174.
- BARKER, D.J.P., GLUCKMAN, P.D., GODFREY, K.M., HARDING, J.E., OWENS, J.A. & ROBINSON, J.S. 1993a. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 2341, 938-941.
- BARKER, D.J.P., HALES, C.N., FALL, C.H.D., OSMOND, C., PHIPPS, K. & CLARK, P.M.S. 1993b. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36, 62-67.
- CAMMACK, K.M., LEYMASTER, K.A., JENKINS, T.G. & NIELSEN, M.K. 2005. Estimates of genetic parameters for feed intake, feeding behavior, and daily gain in composite ram lambs. *Journal of Animal Science* 83, 777-785.
- FAO, 2009. The State of Food and Agriculture (SOFA) – Livestock in the balance. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Disponible Online: <http://www.fao.org/3/i0680e/i0680e00.htm> [Consultado el 15/03/2020].
- FAO, 2016. The State of Food and Agriculture (SOFA) – Climate change, agriculture and food security. Food and Agricultural Organization of the United Nations.

Disponible Online: <http://www.fao.org/publications/sofa/2016/en/> [Consultado el 15/03/2020].

- FERNÁNDEZ-GINÉS, J.M., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., SAYAS-BARBERÁ, E. & PÉREZ-ÁLVAREZ, J. 2005. Meat products as functional foods. A review. *Journal of Food Science* 70, R37-R43.
- FRIEDRICH, T. 2014. Producción de alimentos de origen animal. Actualidad y perspectivas. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 48, 5-6.
- GERBER, P.J., STEINFELD, H., HENDERSON, B., MOTTET, A., OPIO, C., DIJKMAN, J., FALCUCCI, A. & TEMPIO, G. 2013. Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Disponible Online: <http://www.fao.org/3/i3437e/i3437e00.htm> [Consultado el 15/03/2020].
- KHIAOSA-ARD, R. & ZEBELI, Q. 2014. Cattle's variation in rumen ecology and metabolism and its contributions to feed efficiency. *Livestock Science* 162, 66-75.
- LISTRAT, A., LEBRET, I., LOUVEAU, I., ASTRUC, T., BONNET, M., LEFAUCHEUR, L., PICARD, B. & BUGEON, J. 2016. How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *TheScientificWorldJournal* 2016, 3182746.
- MAKKAR, H.P.S. 2016. Smart livestock feeding strategies for harvesting triple gain – the desired outcomes in planet, people and profit dimensions: a developing country perspective. *Animal Production Science* 56, 519-534.
- MICHA, R., WALLACE, S.K. & MOZAFFARIAN, D. 2010. Red and processed meat consumption and risk of incident coronary heart disease, stroke, and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 121, 2271-2283.
- MIN, B.R., BARRY, T.N., ATTWOOD, G.T. & MCNABB, W.C. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology* 106, 3-19.

- MONTANHOLI, Y.R., ODONGO, N.E., SWANSON, K.C., SCHENKEL, F.S., MCBRIDE, B.W. & MILLER, S.P. 2008. Application of infrared thermography as an indicator of heat and methane production and its use in the study of skin temperature in response to physiological events in dairy cattle (*Bos taurus*). *Journal of Thermal Biology* 33, 468-475.
- MORÁN, L., ANDRÉS, S., BODAS, R., BENAVIDES, J., PRIETO, N., PÉREZ, V., GIRÁLDEZ, F.J. 2012. Antioxidants included in the diet of fattening lambs: Effects on immune response, stress, welfare and distal gut microbiota. *Animal Feed Science and Technology* 173, 177-185.
- MORÁN, L., GIRÁLDEZ, F.J., BODAS, R., BENAVIDES, J., PRIETO, N., ANDRÉS, S. 2013. Metabolic acidosis corrected by including antioxidants in diets of fattening lambs. *Small Ruminant Research* 109, 133-135.
- UNITED NATIONS, 2019. World Population Prospects 2019. Department of Economic and Social Affairs, Population Division. Disponible Online: <https://population.un.org/wpp/Publications/> [Consultado el 14/05/2020].
- WOOD, J.D., ENSER, M., FISHER, A.V., NUTE, G.R., SHEARD, P.R., RICHARDSON, R.I., HUGHES, S.I. & WHITTINGTON, F.M. 2008. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science* 78, 343-358.

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo expuesto, esta Tesis Doctoral plantea como hipótesis inicial que la eficiencia alimentaria durante las fases de cebo y recría de corderos se ve afectada por el nivel de alimentación durante el periodo de lactancia. Partiendo de esta base, se plantearon los siguientes objetivos concretos:

- 1-** Identificar mediante herramientas –ómicas (transcriptómica, metabolómica y proteómica) los mecanismos moleculares que se desencadenan como consecuencia de diferentes niveles de alimentación en la etapa de lactancia y que pueden provocar diferencias en la eficiencia alimentaria de corderos durante las etapas de cebo y recría.
- 2-** Aclarar si el nivel de alimentación en la lactancia afecta a la eficiencia alimentaria en las etapas de cebo y recría a través de la modificación de los parámetros de digestibilidad, de fermentación ruminal e intestinal y de la microbiota del contenido del tracto digestivo.
- 3-** Describir las características relacionadas con la calidad de la canal y de la carne durante la etapa de cebo de corderos con diferentes niveles de alimentación en la etapa de lactancia.
- 4-** Y, por último, estudiar el efecto de diferentes niveles de alimentación en la lactancia sobre el establecimiento de la pubertad en corderas de recría.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para lograr los objetivos anteriormente planteados, se diseñaron y ejecutaron dos pruebas experimentales independientes, que se describen a continuación:

1. Experimento I

El objetivo de la primera prueba experimental fue evaluar el efecto del diferente nivel de alimentación durante el periodo de lactancia sobre la eficiencia alimentaria durante la fase de cebo, y la calidad de la canal y de la carne de corderos merinos de engorde. Se utilizaron 24 corderos recién nacidos que se asignaron a dos grupos experimentales de 12 animales cada uno, alojados en jaulas individuales con sus madres. Durante la lactancia, los animales del grupo *ad libitum* (ADL) permanecieron 24 horas al día con las madres, mientras que los del grupo restringido (RES) permanecieron separados de sus madres durante nueve horas, las cuales se ordeñaron todos los días una hora antes de reunirse con los corderos para asegurar la restricción de alimento. Los animales se pesaron al nacimiento y dos veces a la semana durante todo el experimento. Cuando alcanzaron los 13,5 kg de peso, todos los animales se sometieron a un destete progresivo (ración completa granulada, paja y alfalfa a voluntad) y se destetaron definitivamente a los 15 kg de peso.

A partir de este momento, y hasta el momento del sacrificio (al alcanzar los 27 kg de peso), se alojaron en jaulas individuales y se alimentaron con la misma ración completa granulada administrada de forma restringida en función del peso (35 g/kg de peso vivo al día) en una sola toma diaria suministrada a las 09:00 h. Se recogieron diariamente los restos de alimento, determinando una vez a la semana la materia seca de los mismos con el fin de calcular la ingestión de materia seca (IMS) de cada animal. En torno a los 20 kg de peso, se tomaron muestras de heces del recto para estimar la digestibilidad de ambos grupos. Además, se realizó un sangrado días antes del sacrificio (a los 25 kg PV) para estudiar el perfil metabólico del plasma.

Tras el sacrificio, se registró el peso de diferentes órganos y de la canal caliente y fría tras 24 horas de oreo. En la media canal izquierda se realizó el despiece comercial y cada pieza fue pesada para calcular su proporción sobre la canal. La calidad de la canal y de la carne se evaluó en el músculo *longissimus thoracis et lumborum* (LTL). En él se midió el pH a las 0 horas, a los 45 minutos y a las 24 horas *post mortem*, así como el color de la grasa subcutánea a las 24 horas (porción de *longissimus thoracis*, LT), momento en el que se extrajo el músculo de la canal y se seccionó para medir la

evolución del color y la peroxidación lipídica de muestras de carne cruda, así como las pérdidas por cocinado, la textura y el perfil de compuestos volátiles de la carne cocinada (porción de *longissimus lumborum*, LL). Sobre el *longissimus thoracis* (LT) se realizó el análisis de composición química, la determinación del perfil de ácidos grasos y el estudio histológico.

Por otro lado, se tomaron muestras de hígado para determinar el contenido de grasa y evaluar la expresión génica y proteómica. Además, se tomaron muestras de contenido ruminal e intestinal para caracterizar la microbiota presente y su interacción con los parámetros de fermentación a este nivel (ácidos grasos volátiles, láctico y amoníaco), así como el perfil de ácidos grasos del contenido ruminal. Por último, se tomaron muestras de intestino para determinar la longitud de las vellosidades a nivel del íleon a través del estudio histológico.

2. Experimento II

La segunda prueba experimental se llevó a cabo con corderas de cría de raza assaf. Se siguió un procedimiento similar al experimento 1 y, además, se estudió el efecto de diferentes niveles de alimentación en la lactancia sobre la eficiencia alimentaria y el establecimiento de la pubertad en la fase de cría. En este caso, los animales recién nacidos se dividieron en dos grupos de 20 corderas cada uno, alojados en jaulas individuales durante la lactancia (en este caso artificial): los animales del primer grupo se alimentaron *ad libitum* (ADL), mientras que los animales del grupo restringido (RES) recibieron aproximadamente el 62,5% de la cantidad administrada al grupo ADL (en dos tomas). Los animales se pesaron al nacimiento y dos veces a la semana durante todo el experimento.

Durante el periodo de lactancia, se sacrificaron ocho animales representativos de cada grupo a la misma edad, aproximadamente a los 35 días de vida. La toma de muestras *post mortem* fue similar al Experimento I, exceptuando las características de la calidad de la canal y de la carne, y los parámetros de diversidad microbiana y fermentación ruminal. También se tomaron muestras de hígado para determinar el contenido de grasa y la peroxidación lipídica.

En cuanto al resto de animales que no se sacrificaron, cuando alcanzaron los 13,5 kg de peso (en el caso del grupo ADL) o los 11,5 kg de peso (grupo RES), se sometieron a un destete progresivo (pienso de arranque, heno de alfalfa y agua a

voluntad). Desde el destete, todos los animales se alimentaron *ad libitum* con la misma ración completa (unifeed), alfalfa y agua a voluntad.

Para establecer el momento de la pubertad, se determinó semanalmente el nivel de progesterona sérica (desde los 4 meses de edad hasta el final del experimento, a los 9,5 meses de edad, aprox.). Además, se realizaron estudios de metabolómica, se estimó la digestibilidad (a los 8 meses de edad aproximadamente) y se llevó a cabo un control diario de ingestión durante parte del periodo de recría (8 semanas) con el fin de calcular el consumo residual de alimento (*residual feed intake*, RFI) como medida de eficiencia (calculada como la diferencia entre la ingesta actual de alimento y la ingesta prevista). Para ello, se alojaron en jaulas individuales y se alimentaron con la misma ración completa (unifeed) administrada *ad libitum*, cuya cantidad se aumentaba en función de los restos. Durante este periodo, los animales se pesaron una vez a la semana.

Considerando que el presente trabajo de investigación se presenta con el modelo de compendio de artículos, los resultados obtenidos se han separado lógicamente en diferentes artículos científicos. No obstante, el trabajo de investigación que se incluye en la presente memoria se diseñó con un planteamiento holístico e interdisciplinar.

La primera prueba experimental se corresponde con los artículos de los capítulos I, II y III:

- **Capítulo I:** se recogen los resultados de los parámetros productivos y de eficiencia, así como el perfil proteómico del hígado.
- **Capítulo II:** comprende los resultados del perfil transcriptómico del hígado y del perfil metabolómico del plasma.
- **Capítulo III:** se presentan los resultados de calidad de la canal y de la carne.

La segunda prueba experimental se corresponde con los artículos del capítulo IV y V:

- **Capítulo IV:** se recogen los resultados del perfil transcriptómico y proteómico del hígado de las corderas sacrificadas.
- **Capítulo V:** se recogen los resultados de los parámetros productivos y reproductivos, eficiencia alimentaria y el análisis del perfil metabolómico del plasma de las corderas en la fase de recría.

La metodología empleada en cada prueba experimental, así como los resultados obtenidos, se encuentran ampliamente detallados en los artículos correspondientes.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Líneas de investigación en Europa: Horizonte 2020

Se ha estimado que el crecimiento demográfico, tanto en países industrializados como en países en vías de desarrollo, unido al desarrollo económico de los llamados “países de economía emergente” provocará que la demanda de alimentos en 2050 supere en un 70% a la demanda del año 2010. Se calcula que, en 2050, habrá que alimentar a una población de 9700 millones, de los cuales el 70% vivirá en centros urbanos (FAO, 2009; Friedrich, 2014; United Nations, 2019). Este crecimiento demográfico constante unido al fenómeno de urbanización, deja al mismo tiempo un espacio físico limitado para la expansión de la producción pecuaria. En consecuencia, hacer un uso eficiente de los recursos alimentarios existentes es cada vez más importante. A lo largo de la última mitad del siglo XX, además, se ha producido una intensificación de los sistemas de producción, de forma que en la ganadería moderna se busca rentabilizar al máximo el consumo de alimento y minimizar las pérdidas de energía para alcanzar el máximo potencial de producción (Fraser *et al.*, 2001; Araujo-Febres, 2005; Fraser, 2006; Masaquiza Moposita *et al.*, 2017).

Este objetivo, es decir, el desarrollo de estrategias productivas para aumentar la eficiencia alimentaria de los animales de abasto, se incluye en el programa Horizonte 2020 de la Unión Europea (H2020). Más concretamente, la comunidad científica encargada de establecer las acciones necesarias centra sus estrategias en promover la sostenibilidad y competitividad del sector ganadero en Europa mediante la investigación e innovación para producir alimentos de alta calidad (sanos y seguros), respetar el bienestar e integridad de los animales, reducir el impacto ambiental y mejorar el aprovechamiento de los recursos (Animal Task Force, 2013).

En este sentido, no se debe olvidar la producción ecológica u orgánica, cuyo crecimiento durante los últimos años puede interpretarse como una respuesta a la preocupación de los consumidores por aspectos como la influencia de la alimentación sobre la salud, la contaminación ambiental y el bienestar animal (Sánchez *et al.*, 2000; Alonso Mielgo, 2002). Se trata de sistemas alternativos de producción de alimentos de alta calidad, en competencia con los sistemas tradicionales de explotación animal intensiva (Second White Paper of the Animal Task Force, 2016). Sin embargo, pese a ser un sector en crecimiento, el consumo de productos ecológicos en España apenas alcanza el 2% sobre el total (bastante inferior al promedio europeo) (MAPAMA, 2017), probablemente debido a su elevado precio de mercado en comparación a los productos

convencionales. Así pues, y con independencia de los sistemas de producción ecológica, el sector ganadero de la UE debe cumplir con las exigencias de producción de la UE (cuestiones medioambientales, bienestar animal, productos seguros de alta calidad, etc.) logrando, al mismo tiempo, poner en el mercado productos a un precio competitivo. Por todo ello, mejorar la eficiencia alimentaria de los animales es un objetivo fundamental en la industria agroalimentaria, en general, y para el sector ganadero, en particular (Second White Paper of the Animal Task Force, 2016).

Como consecuencia de esta prioridad, a lo largo de los últimos años se han desarrollado diversos estudios encaminados a aumentar la eficiencia alimentaria de los animales, reduciendo el índice de conversión (IC) (es decir, la cantidad de alimento necesaria para producir una unidad de producto animal) y contribuyendo, por tanto, a la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) asociados a la producción animal. Aunque en los últimos años ya se han logrado disminuciones significativas del IC mediante la aplicación de programas de mejora genética y el empleo de sistemas de alimentación intensivos, basados en la utilización de alimentos de elevado valor nutritivo, todavía se esperan más avances con el fin de mejorar la eficiencia alimentaria de los animales, combinando las estrategias de alimentación, la genómica y aspectos relacionados con la salud y el bienestar animal (Animal Task Force, 2013; Second White Paper of the Animal Task Force, 2016).

Cabe señalar que los mismos retos se recogen en el Plan Estatal de I+D+i (Estrategia Española de Ciencia y Tecnología y de Innovación 2013-2020) y en varias estrategias regionales de investigación e innovación orientadas a lograr una especialización inteligente, así como una Europa más eficiente en el uso de los recursos.

2. El sector ovino en España

El sector agroalimentario en general y la ganadería, en particular, son actividades económicas relevantes en gran parte de las comunidades autónomas de nuestro país. El sector ovino y caprino representa en España el 12% de la Producción Final Ganadera (PFG), teniendo en cuenta tanto el subsector cárnico como el lácteo. Con un censo ovino que en los últimos años se encuentra alrededor de los 15-16 millones de cabezas, nuestro país pasa a ser el primero en importancia productiva de la Unión Europea, tras la salida del Reino Unido (EUROSTAT, 2020).

Sin embargo, en los últimos años, la producción de carne de ovino en España ha sufrido una fuerte reducción, acompañada de un notable descenso del consumo de este tipo de carne (figuras 1 y 2). Estos descensos se pueden atribuir a diferentes causas, tanto de naturaleza económica (elevados costes de producción y, por ende, alto precio del producto en el mercado), como de naturaleza social (variación en las preferencias y hábitos de consumo, etc.) (Cruz, 2013; MAPAMA, 2016).

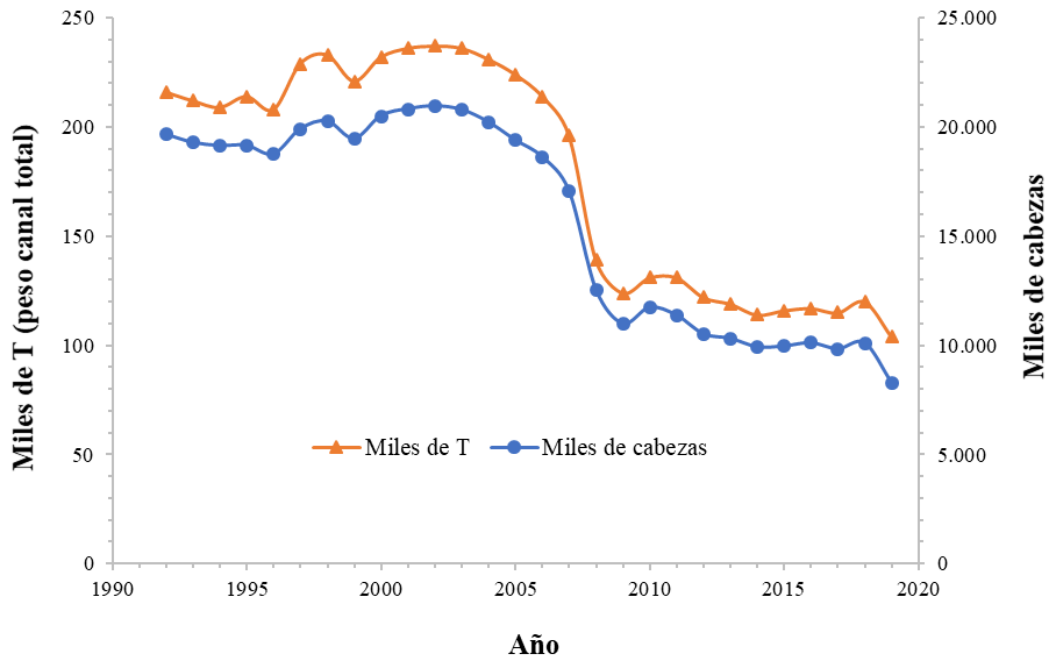


Figura 1. Evolución de las producciones de carne de ovino en España (T, toneladas) (MAPA, 2018, MAPA, 2019a).

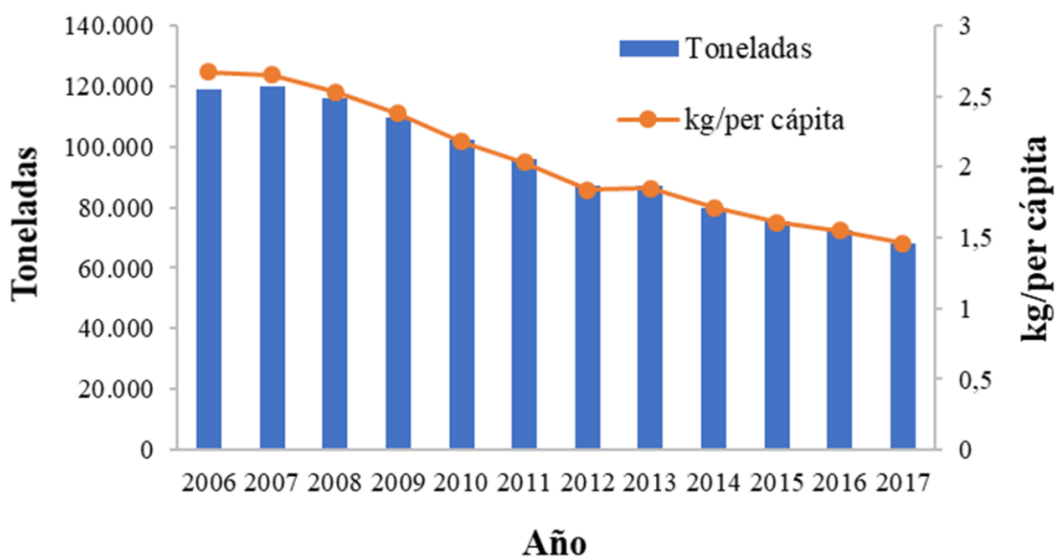


Figura 2. Evolución del consumo de carne fresca de ovino y caprino en los hogares españoles (MAPA, 2018).

En España se comercializan diferentes tipos de cordero en función de la edad, el peso al sacrificio, manejo y la alimentación recibida. Entre ellos, la producción de corderos lechales y corderos de cebo precoz representan la mayor parte de la carne de ovino producida en España (MAPA, 2019a). De acuerdo con el RD 815/2018, de 6 de julio, los corderos se pueden clasificar en ligeros o pesados, si el peso de la canal es inferior a 13 kg o de igual o mayor peso, respectivamente. Entre los corderos de tipo ligero se encuentran el cordero lechal y el ternasco o recental:

El **cordero lechal o lechazo** se alimenta exclusivamente de leche y se sacrifica en torno a los 9-12 kg de peso vivo, que alcanza con una edad comprendida entre los 25 y 45 días de vida. Estos corderos proceden fundamentalmente de razas de aptitud lechera, como la latxa, churra, castellana, manchega o assaf y sus cruces (Sañudo *et al.*, 1998; Ciria *et al.*, 2009; Sañudo *et al.*, 2009; MAPA, 2019b). El **cordero ternasco o recental** es sacrificado con una edad inferior a los 4 meses y un peso de la canal entre los 8,5 y los 13 kg. Es alimentado con la leche materna y concentrado *ad libitum* (ternasco de cebo) o pasto (ternasco de pasto).

El **cordero de cebo pesado** representa un pequeño número de animales en nuestro país. Tras el destete, los animales se ceban intensivamente con concentrado hasta los 30-40 kg de peso vivo, aproximadamente a los 4 o 5 meses de edad. El peso de la canal se sitúa en torno a los 18 kg (Sañudo *et al.*, 1998).

Además de las categorías mencionadas también cabe destacar el cordero pascual y el cordero de cebo precoz, que podrían entrar en la categoría de corderos ligeros o pesados, según la edad y peso al sacrificio. En general, los **corderos pascuales** se sacrifican con una edad superior a los 4 meses y un peso vivo comprendido entre los 23 y 26 kg (12-14 kg de peso de la canal). Su carne tiene un sabor más pronunciado que el lechal o el ternasco (Sañudo *et al.*, 1998; Ciria *et al.*, 2009; Sañudo *et al.*, 2009; MAPA, 2019b).

Los **corderos de cebo precoz** representan el 5-6% de la producción de carne de animales domésticos. Estos corderos se destetan cuando tienen 14-16 kg de peso vivo para cebarlos intensivamente en estabulación con piensos compuestos basados en cereales, y se sacrifican con pesos comprendidos entre los 25 y los 30 kg, y con edades que se sitúan entre los 3 y 4 meses. La mayor parte de las razas españolas en su pureza o

en cruce pueden dar lugar a este tipo de cordero (Sañudo *et al.*, 1998; Ciria *et al.*, 2009; Sañudo *et al.*, 2009).

Además de carne de cordero, también se produce carne de **ovino mayor**, que es aquella procedente de animales que tienen más de un año de edad. Su consumo en España no es muy alto, aunque se usa ocasionalmente en el norte para elaborar cecina de oveja (Sañudo *et al.*, 1998).

3. Eficiencia alimentaria

Antes de profundizar en el concepto de eficiencia alimentaria, es preciso definir los procesos de crecimiento y desarrollo de un animal.

Tradicionalmente, se ha definido el **crecimiento** como el aumento de peso y tamaño del animal hasta que se alcanza el tamaño adulto (Hammond, 1966). Dicho crecimiento presupone un aumento de la masa orgánica total, procedente de un incremento del tamaño de los tejidos y órganos individuales (Carlson, 1972). Es importante también la definición desde un punto de vista bioquímico como el predominio de la síntesis proteica sobre la degradación en casi todos los tejidos orgánicos simultáneamente, lo que representa la diferencia entre el anabolismo y el catabolismo (Graham, 1982). Por su parte, el término **desarrollo** hace referencia a aquellos cambios en la forma y en las proporciones corporales asociados con el crecimiento (Butterfield, 1988). En los animales de granja, el principal interés de este proceso recae en el crecimiento de partes específicas del animal, tales como el hueso, el músculo o la grasa, y en el desarrollo de la glándula mamaria (Lawrence y Fowler, 2002).

De forma general, y si consideramos únicamente la etapa posnatal, se establece que la curva de crecimiento potencial del cordero bajo condiciones ambientales óptimas es típicamente sigmoide (figura 3), y la velocidad de crecimiento se acelera hasta la pubertad para luego disminuir progresivamente a medida que el peso se acerca hacia un valor asintótico, denominado peso adulto o madurez (Lawrence y Fowler, 2002; McDonald *et al.*, 2013). Hay que señalar que la tasa de crecimiento y desarrollo relativo de los tejidos puede ser modificado por la composición de la dieta, raza, sexo y condiciones ambientales, tales como enfermedades y temperaturas ambientales extremas (Black, 1983).

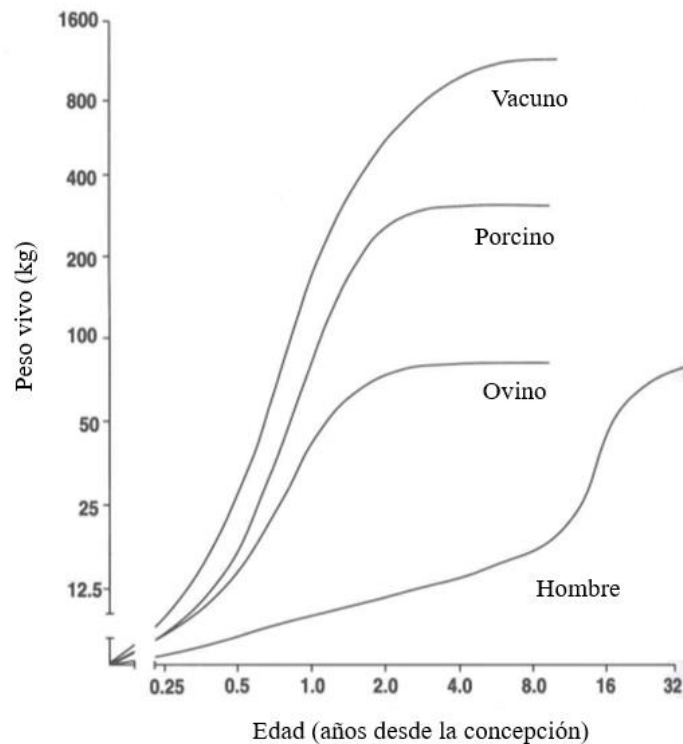


Figura 3. Curva de crecimiento para diversas especies de ganado y el ser humano (Lawrence y Fowler, 2002).

En este punto, y debido a la naturaleza del presente trabajo, es importante mencionar también el denominado **crecimiento compensatorio**, que se define como el rápido incremento en la tasa de crecimiento relativo a la edad, exhibido por mamíferos y aves que son alimentados en forma adecuada a sus necesidades nutritivas tras un periodo de restricción nutricional suficiente para detener o ralentizar el crecimiento (Wilson y Osbourne, 1960; Randall *et al.*, 1998). Según Thomson *et al.* (1982), el crecimiento compensatorio se puede explicar por tres factores interdependientes: una reducción de las necesidades de mantenimiento (atribuidas a la menor masa corporal), una disminución en el valor energético de la ganancia de peso (VE_g , Mcal/kg) y una mayor eficiencia en la utilización del alimento. Asimismo, el aumento de la capacidad de ingestión es también un factor importante, especialmente al inicio de la fase de realimentación. Este fenómeno ha sido empleado como estrategia productiva para reducir los costes de alimentación (disminuyendo la cantidad de alimento suministrada durante la fase de crecimiento, seguido de un periodo de realimentación) o variar las características de la canal del animal en producción (Carstens *et al.*, 1991; Yambayamba *et al.*, 1996; Luna-Pinto y Cronjé, 2000).

Por otra parte, en la mayoría de los estudios se define la **eficiencia alimentaria** como la ratio de producto obtenido (p ej. producción de leche o ganancia de peso) por alimento consumido, o viceversa (Korver, 1988). De esta forma, si se comparan, por ejemplo, animales que experimenten la misma ganancia de peso, aquellos que consuman menos alimento serán más eficientes.

Esto es importante, ya que la alimentación representa el mayor coste en la producción ovina, pudiendo llegar a representar entre el 65% y el 70% del coste total de producción (Cammack *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2017). En consecuencia, una de las estrategias para incrementar la rentabilidad de las explotaciones implica mejorar la eficiencia de conversión del alimento en el producto final (Santana *et al.*, 2014). En este sentido, y en lo que a producción de carne de cordero se refiere, se ha demostrado que para lograr la misma ganancia diaria de peso (GDP), hay diferencias en la ingestión de materia seca (IMS) de hasta un 27% entre los animales más y menos eficientes (Saro *et al.*, 2019).

No obstante, es importante mencionar que la eficiencia alimentaria (tomando como referencia un mismo alimento o dieta) se puede mejorar mediante la combinación de:

- (1) reducción del consumo de alimento sin cambios en la ganancia de peso,
- (2) aumento de la ganancia de peso sin cambios en la ingestión de alimento, o
- (3) reducción del consumo de alimento con aumento de la ganancia de peso.

Todas estas posibilidades reflejan diferencias en las bases moleculares y metabólicas. Por ello, las investigaciones sobre la eficiencia alimentaria deben ser estrictas y consistentes en la definición del diseño experimental y la metodología empleada, así como en la especificación de los resultados obtenidos (Lee *et al.*, 2015). En este sentido, existen diversos índices para medir la eficiencia alimentaria, tales como el índice de conversión (IC, cantidad de alimento necesaria para producir una unidad de producto animal) o su inverso matemático (producto obtenido por unidad de alimento consumido), la ganancia residual de peso (*residual body weight gain*, RG; ganancia de peso ajustada para el nivel de ingestión y el peso vivo), el consumo residual de alimento (*residual feed intake*, RFI), la tasa de crecimiento relativo (*relative growth rate*, RGR; potencial de crecimiento relativo al grado de madurez) y el índice de Kleiber (relaciona

la tasa de crecimiento con el peso metabólico). Estos dos últimos, sin embargo, se consideran medidas indirectas de la eficiencia alimentaria, puesto que no requieren una medida de la ingestión de alimento. No obstante, pueden emplearse como tal si todos los animales se alimentan con la misma dieta a un nivel restringido (Archer *et al.*, 1999; Berry y Crowley, 2013; Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2018).

Aunque tradicionalmente el IC ha sido la medida más ampliamente utilizada para la eficiencia alimentaria, actualmente está cobrando especial importancia el RFI (g/día), que se presenta como medida alternativa. Fue propuesta por primera vez por Koch *et al.* en 1963 para el ganado vacuno y se define como la diferencia entre la ingesta de alimento real u observada y la ingesta esperada o estimada para un animal, en función de sus necesidades nutritivas para el mantenimiento (que dependen del peso vivo) y del nivel de producción (ganancia de peso).

De esta forma, el RFI es independiente del ritmo de crecimiento y del peso vivo. Así, a diferencia de otros índices empleados para cuantificar la eficiencia, el RFI no está correlacionado fenotípicamente con el peso corporal, la tasa de crecimiento ni otras medidas de energía u otros caracteres de importancia económica, lo cual tiene implicaciones importantes y deseables con respecto al diseño de programas de selección para la mejora genética de la eficiencia alimentaria (Arthur *et al.*, 2001a,b; Basarab *et al.*, 2003; Crews Jr., 2005; Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2018).

El cálculo de RFI es simplemente una aplicación de un procedimiento estadístico de regresión lineal múltiple, utilizando la siguiente fórmula:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 MBW_i + \beta_2 ADG_i + e_i,$$

Donde Y_i representa la ingesta de materia seca esperada del animal i ; β_0 es la intersección de la ecuación; β_1 , el coeficiente de regresión para el peso metabólico medio (MBW, como $BW^{0.75}$); β_2 , el coeficiente de regresión para la ganancia diaria de peso (ADG); y e_i , el error residual del animal i . Por lo tanto, esta predicción puede considerarse como el valor promedio o esperado para animales de pesos y tasas de crecimiento similares.

La ingesta de alimento diaria real u observada menos la ingesta de alimento esperada de cada individuo corresponde al consumo residual de alimento, es decir, el RFI (Knott *et al.*, 2008). De esta forma, los animales con valores negativos y bajos de

RFI presentan una ingestión menor que la esperada para su tasa de crecimiento y peso corporal, de manera que son más eficientes. Por el contrario, los individuos con valores positivos y elevados de RFI son menos eficientes (comen más) (Archer *et al.*, 1999; Crews Jr., 2005; Knott *et al.*, 2008). En un grupo, aproximadamente el mismo número de animales tendrán valores de RFI por encima y por debajo de cero, de tal manera que el valor medio del RFI dentro de un grupo es cero.

Sin embargo, la determinación del RFI puede ser costosa, ya que requiere controlar la ingesta individual de los animales durante periodos prolongados de tiempo, lo que dificulta su aplicación como método de selección en las explotaciones ganaderas. Además, otro inconveniente es que los animales con el mismo RFI podrían tener diferente ganancia diaria de peso. Así, a pesar de presentar valores bajos de RFI (individuos considerados más eficientes), los individuos con menor consumo de alimento y menores ganancias de peso pueden ser menos rentables. Por ello, Berry y Crowley (2012) propusieron una nueva medida alternativa para este problema: la ingesta y ganancia de peso residuales (*residual intake and body weight gain*, RIG), que tiene en cuenta tanto el RFI como la ganancia de peso residual y, por tanto, es capaz de identificar a los animales con un crecimiento rápido que, al mismo tiempo, tienen una ingesta de alimento menor que el promedio del grupo, con independencia del peso vivo.

4. Factores que afectan a la eficiencia alimentaria

Existen múltiples factores que pueden afectar a la eficiencia alimentaria de los animales. Podemos clasificarlos en tres grandes grupos: genéticos, fisiológicos y ambientales (p. ej., alimentación).

4. 1. Factores genéticos

La selección de los animales con el fin de mejorar el rendimiento productivo ha sido desde siempre uno de los principales fines de los programas de mejora genética. Sin embargo, estos programas han tropezado siempre con un gran problema: el hecho de que las principales características deseables, tales como una tasa de crecimiento rápido, la eficiencia de conversión del alimento y los atributos de la canal y de la carne, estén controlados por muchos genes (Lawrence y Fowler, 2002). Además, aún no se conocen por completo los mecanismos a través de los cuales interactúan los genes con los parámetros bioquímicos y fisiológicos que controlan el crecimiento.

Existen evidencias de una base genética para la variación en la eficiencia alimentaria en el ganado vacuno, con valores estimados de heredabilidad para el RFI que van desde bajos a moderados (Archer *et al.*, 1999; Pitchford, 2004). Además, Gravert (1985) encontró, en el ganado vacuno, variación genética en el consumo de alimento tanto entre razas como dentro de una misma raza.

En la especie ovina, aproximadamente el 25% de la variación en el consumo de alimento y en la tasa de crecimiento está determinada genéticamente. Los mismos genes que determinan un aumento en la tasa de crecimiento, también incrementan en gran medida el consumo de alimento. Por ello, es un reto importante desarrollar procedimientos de selección genética para aumentar la tasa de crecimiento sin aumentar el consumo de alimento. El RFI solventa este problema, ya que se calcula teniendo en cuenta las necesidades de mantenimiento y el ritmo de crecimiento de cada animal. Así, se ha demostrado que la selección para el RFI está asociada con diferencias en la ingestión, de manera que, para la misma ganancia de peso, son más eficientes aquellos animales que consumen menos cantidad (Herd y Arthur, 2009). Además, se ha demostrado que los corderos con mayor consumo de alimento y tasa de crecimiento tienden a realizar más comidas por día y pasan más tiempo comiendo (Cammack *et al.*, 2005). No obstante, se ha observado una correlación genética y fenotípica positiva entre estos parámetros (número de comidas realizadas al día, tiempo diario empleado en comer y consumo diario de alimento) y el RFI, lo que sugiere una menor eficiencia alimentaria en estos animales (Cammack *et al.*, 2005).

4.2. Factores fisiológicos

En términos generales, existen cinco procesos fisiológicos importantes que probablemente afectan al RFI y, por tanto, a la eficiencia alimentaria. Estos son procesos relacionados con la ingestión de alimento, la digestión, el metabolismo (anabolismo y catabolismo, incluyendo variaciones en la composición corporal), la actividad física y la termorregulación (Herd *et al.*, 2004; Herd y Arthur, 2009). Richardson y Herd (2004) estimaron la importancia de la contribución de los diferentes procesos biológicos y fisiológicos a la variación en el RFI en el ganado vacuno (figura 4).

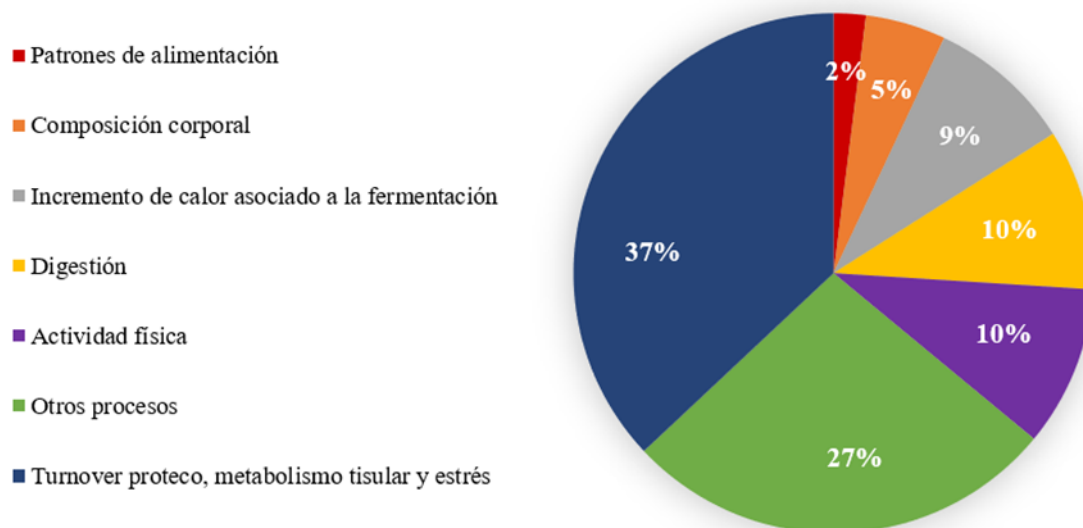


Figura 4. Contribución de los diferentes mecanismos biológicos a la variación en el RFI en el ganado vacuno (Richardson y Herd, 2004).

4.2.1. Ingestión

Son varios los factores que controlan el rendimiento productivo en los rumiantes, pero quizá el más importante sea la ingestión de alimento (Herd y Arthur, 2009). Se puede definir la **ingestión voluntaria** como el consumo realizado por un animal o un grupo de animales durante un periodo de tiempo en el cual tienen libre acceso a los alimentos (Forbes, 1986).

La capacidad de ingestión depende, entre otros factores, de las necesidades de mantenimiento y del nivel de producción (Herd y Arthur, 2009; Arthur y Herd, 2012). Además, la ingestión de alimento también depende del apetito del animal (entendido como el impulso instintivo que lleva a satisfacer el deseo o la necesidad de comer), el cual varía de un animal a otro (Preston y Leng, 1989).

Los mecanismos de control de la ingestión de alimento son muy complejos e incluyen múltiples factores (Della-Fera y Baile, 1984). El consumo de alimentos ocasiona cambios en el organismo que son controlados por el cerebro. Estos cambios pueden producirse en el tracto gastrointestinal y ser de naturaleza física (p. ej., distensión ruminal) o química (p. ej., productos de la digestión); también se liberan hormonas y metabolitos al torrente sanguíneo (p. ej., secreción de péptidos que provocan la sensación de saciedad en el cerebro) (Woods y Gibbs, 1989; Forbes, 2007). Por otro lado, a medida que aumenta la ingestión de alimento, aumenta el gasto de

energía empleada para digerir el mismo, en parte debido al aumento de tamaño de los órganos digestivos y al aumento de la energía consumida por los propios tejidos (Herd y Arthur, 2009). En rumiantes, el peso del hígado y del tracto gastrointestinal parecen tener una relación directamente proporcional con el nivel de ingestión (Johnson *et al.*, 1990). De hecho, se ha demostrado en diferentes especies animales que una disminución del nivel de ingestión implica una reducción en la tasa metabólica por la reducción en el tamaño de órganos como el hígado, riñón, estómago e intestinos (Burrin *et al.*, 1990).

Por otra parte, también se ha demostrado que aquellos animales que han pasado por un periodo de subnutrición moderada ingieren más cantidad de alimento que animales que estuvieron bien alimentados previamente, experimentando, además, una mayor tasa de crecimiento y eficiencia alimentaria, factores que contribuyen al crecimiento compensatorio observado (Greeff *et al.*, 1986).

El comportamiento ingestivo, que incluye la frecuencia (número de comidas o número de visitas al comedero/día), la duración (min/día) y el ritmo o velocidad (g MS/min) de ingestión, probablemente también juega un papel muy importante en la variación subyacente de la eficiencia alimentaria en el ganado (Kelly *et al.*, 2010; Montanholi *et al.*, 2010; Fitzsimons *et al.*, 2017).

De esta manera, la variación en la eficiencia alimentaria puede ser, al menos en parte, el resultado de las diferencias en el gasto de energía asociado con ciertos comportamientos (Montanholi *et al.*, 2010). De hecho, existen evidencias de que el ganado de carne con distintas eficiencias de alimentación puede tener diferentes comportamientos ingestivos (Richardson y Herd, 2004; Nkrumah *et al.*, 2006; Golden *et al.*, 2008). En otro trabajo realizado en novillos (Robinson y Oddy, 2004), se observó que los animales con mayor RFI empleaban más tiempo en comer (min/día), realizaban mayor número de comidas al día y presentaban un ritmo de alimentación más rápido (g MS/min). De acuerdo a los resultados observados por Richardson (2003), Nkrumah *et al.* (2006) también encontraron que los novillos con mayor RFI empleaban hasta un 50% más de tiempo comiendo en comparación con los animales con menor RFI (más eficientes). Por su parte, en el trabajo de Montanholi *et al.* (2010), los novillos más eficientes (bajo RFI) también presentaron menor ritmo de ingestión y menos visitas diarias al comedero en comparación con los animales menos eficientes. Por lo tanto, las características del comportamiento ingestivo están potencialmente asociadas con el coste energético de la alimentación en el ganado y pueden emplearse en la evaluación

de la eficiencia y del rendimiento productivo de los animales (Adam *et al.*, 1984; Montanholi *et al.*, 2010).

4.2.2. Digestión

Otro posible mecanismo para explicar la variación en la eficiencia de utilización del alimento son las diferencias en los procesos de digestión. Se ha demostrado que los procesos de digestión son responsables de, aproximadamente, un 19% de la variación en el RFI (Herd y Arthur, 2009). Richardson *et al.* (1996) y Nkrumah *et al.* (2006) observaron una correlación negativa entre el RFI y la digestibilidad aparente de la materia seca y la proteína bruta, demostrando que pequeñas diferencias en la digestibilidad pueden provocar grandes diferencias en la eficiencia alimentaria. Con más precisión, Bonilha *et al.* (2017) observaron que los animales con un bajo RFI muestran a menudo un incremento de hasta un 4% en la digestibilidad de la MS (en todo el tracto gastrointestinal). La digestibilidad puede verse afectada por el nivel de ingestión y por la relación de competencia que existe entre la tasa de digestión y el ritmo de paso (Allen y Mertens, 1988). En este sentido, Sauvant y Nozière (2016) encontraron una correlación negativa entre la digestibilidad de la MS y la IMS en rumiantes. Por lo tanto, una mayor digestibilidad general de la MS en los animales con un bajo RFI podría ser consecuencia principalmente de una menor IMS, en lugar de lo contrario (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2018).

En este contexto, y dado que la producción de metano ($\text{g CH}_4/\text{día}$) está linealmente relacionada con la IMS, se podría pensar que la selección para un bajo RFI (y por tanto una menor IMS) podría reducir sustancialmente la producción de metano sin disminuir el crecimiento (Basarab *et al.*, 2013). No obstante, esto podría no ser siempre cierto, puesto que la mayor digestibilidad de la MS observada en estos animales podría aumentar la cantidad de sustrato disponible para la fermentación y la metanogénesis por unidad de alimento (Bonilha *et al.*, 2017; Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2018).

Para solventar el problema asociado con la correlación inherente entre la producción de metano y la IMS, Freetly *et al.* (2015) realizaron un estudio en novillos con diferencias en la ganancia residual (RG, ganancia ajustada a la ingestión y el peso corporal), y no observaron diferencias en la producción diaria de metano entre animales con diferentes RG. Este hallazgo puede indicar que las emisiones de metano no siempre

contribuyen a la variación de la eficiencia alimentaria entre animales (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2018).

Independientemente de la producción de metano, es conocido que el patrón de fermentación, reflejado, por ejemplo, en proporciones variables de ácidos grasos volátiles (AGV) o en la eficiencia de síntesis de proteína microbiana, puede influir en la eficiencia de utilización del alimento (Guan *et al.*, 2008).

A pesar del papel central del ecosistema microbiano del rumen en la utilización de los alimentos en los rumiantes, aún se conoce poco acerca de la relación entre la población microbiana ruminal específica, los parámetros de fermentación ruminal y la eficiencia con la que se utiliza el alimento. Los resultados observados por Guan *et al.* (2008) son los primeros en indicar diferencias en las poblaciones microbianas del rumen de novillos con distinta eficiencia, y sugieren que determinados grupos de bacterias específicas podrían estar presentes únicamente en los animales más eficientes. Además, estos autores encontraron correlaciones entre la concentración de AGV y la eficiencia alimentaria, con mayores niveles de butirato y valerato en los animales más eficientes. Otros autores encontraron una menor concentración de propionato en las novillas más eficientes (bajo RFI) (Krueger *et al.*, 2009a), mientras que Lawrence *et al.* (2011) y Lawrence *et al.* (2013) observaron lo contrario. Por su parte, Krueger *et al.* (2009b) y Fitzsimons *et al.* (2014) no encontraron ningún efecto del RFI en el pH ruminal ni en la producción de AGV. Estas discrepancias entre estudios podrían ser atribuidas al tipo de dieta recibida o a otros factores implicados.

Diversos estudios corroboran la relación entre la microbiota del rumen y la eficiencia alimentaria. En novillos de carne, se identificaron diversos filotipos bacterianos (*Succinibivrio* sp., *Eubacterium* sp., y *Robinsoniella* sp.) potencialmente asociados con el RFI (Hernandez-Sanabria *et al.*, 2012). Así, por ejemplo, se observó una mayor concentración de bacterias del género *Succinivibrio* sp. en los animales más eficientes (Hernandez-Sanabria *et al.*, 2010; Hernandez-Sanabria *et al.*, 2012). Se ha sugerido que estas bacterias utilizan hidrógeno para la producción de succinato, disminuyendo, por tanto, su disponibilidad para la metanogénesis (Pope *et al.*, 2011) y reduciendo así la contaminación ambiental. De igual forma, otros autores han observado una comunidad metanogénica menos diversa en los animales más eficientes (Zhou *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010; Carberry *et al.*, 2012). En este sentido, varios estudios de metagenómica y metatranscriptómica realizados en ganado vacuno de carne (Li y Guan,

2017) y leche (Shabat *et al.*, 2016) también sugieren que el microbioma ruminal es genéticamente menos diverso y activo en los animales más eficientes que en los menos eficientes.

Todo ello podría indicar un microbioma más simple en los animales más eficientes, que utiliza menos sustrato y energía para la proliferación microbiana y, por tanto, permite que una mayor proporción de los nutrientes ingeridos sean utilizados directamente por el hospedador. Esto sugiere que la inhibición de actividades microbianas ruminales innecesarias puede ser una buena estrategia para la mejora de la eficiencia alimentaria en los rumiantes (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2018).

Por otra parte, las características morfológicas del tracto gastrointestinal también juegan un papel importante en la digestión del alimento y, por tanto, en la eficiencia alimentaria (Fitzsimons *et al.*, 2017). Así, es bien sabido, por ejemplo, que un aumento de la superficie de la mucosa intestinal se traduce en una mayor capacidad de absorción (Ganapathy *et al.*, 1994). Si bien existen pocos estudios realizados en rumiantes, Meyer *et al.* (2014) encontraron una correlación negativa entre la densidad de la mucosa yeyunal y el RFI en el ganado. Por su parte, Montanholi *et al.* (2013) observaron un mayor número de células en el epitelio duodenal e ileal de novillos con bajo RFI, en contraposición a los animales con alto RFI.

Por todo ello, es importante considerar las posibles estrategias nutricionales que permitan incrementar la digestibilidad del alimento, disminuir los procesos de metanogénesis, así como modificar el microbioma digestivo en los diferentes sistemas de producción con el fin de aumentar la disponibilidad de nutrientes para el hospedador. Estas prácticas repercutirán en una mayor eficiencia alimentaria y un menor impacto ambiental de la actividad ganadera.

4.2.3. Metabolismo y composición corporal

Algunos estudios sugieren que los animales con una mayor eficiencia alimentaria se caracterizan por tener necesidades energéticas de mantenimiento más bajas (Richardson y Herd, 2004; Herd y Arthur, 2009), y también por una mayor eficiencia de utilización de la energía metabolizable (EM) para el crecimiento, medida al mismo nivel de ingestión (Nkrumah *et al.*, 2006; Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2018).

Las diferencias en las necesidades de energía para el mantenimiento se han atribuido, en parte, al tamaño de los órganos internos (Garrett, 1980; DiCostanzo *et al.*, 1990; Ferrell y Jenkins, 1998). Los órganos tienen una alta actividad metabólica; y entre estos, el hígado y el intestino representan en promedio el 38% del gasto total de energía en el ganado vacuno en crecimiento, que se corresponde aproximadamente con el 60% de las necesidades de energía metabolizable para el mantenimiento (Ortigue-Marty *et al.*, 2017; Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2018). Este alto gasto de energía estaría asociado, en gran medida, con el *turnover* proteico (Garrett, 1980).

Se puede definir el *turnover* proteico (o recambio proteico) como el continuo proceso de degradación y síntesis de proteínas que conduce a la renovación de las proteínas tisulares sin que se produzcan cambios netos en la masa tisular. Por lo tanto, para los animales en crecimiento, la deposición de proteínas se produce porque la síntesis es mayor que la degradación. El *turnover* proteico es esencial para la vida, proporcionando el flujo de aminoácidos que permite el mantenimiento de funciones como la regulación metabólica, la reparación celular o la rápida adaptación a cambios ambientales, entre otros fines (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2018).

En general, en la mayoría de los estudios realizados en animales de producción (Tomas *et al.*, 1991; Oddy *et al.*, 1995; McDonagh *et al.*, 2001; Cruzen *et al.*, 2013), los individuos eficientes parecen adoptar una estrategia de bajo *turnover* proteico, lo que sugiere una asociación negativa entre la eficiencia alimentaria y la tasa de *turnover* proteico, probablemente porque este proceso implica un alto coste de energía para el organismo. De hecho, la síntesis de proteína representa aproximadamente el 23% del gasto total de energía en los rumiantes. En el caso del músculo, la síntesis de proteínas tisulares representa aproximadamente el 15% y la degradación el 8% del gasto energético total del tejido muscular (Caton *et al.*, 2000). Por ello, teóricamente, la forma más económica de lograr mayores eficiencias de crecimiento sería mediante una reducción en la tasa de degradación de la proteína en lugar de un aumento en la tasa de síntesis (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2018). Por otra parte, hay que tener en cuenta que en rumiantes la tasa de *turnover* proteico aumenta a medida que aumenta el nivel de ingestión (Lobley *et al.*, 2000).

Por otra parte, las variaciones en los diferentes procesos metabólicos también afectan a la producción de calor y repercuten en las necesidades energéticas de mantenimiento de un animal. Así, en las diferencias en el metabolismo energético de los

animales, cobra especial importancia la mitocondria y sus diferentes funciones. De hecho, se han observado variaciones en la eficiencia energética de la función mitocondrial que tienen relación con las diferencias fenotípicas en la tasa de crecimiento y en la eficiencia alimentaria de diversos animales de producción (Kolath *et al.*, 2006; Ojano-Dirain *et al.*, 2007; McDonald y Nielsen, 2008). En este sentido, Bottje *et al.* (2002) encontraron diferencias en la actividad de la cadena respiratoria de broilers con diferente eficiencia alimentaria, con una menor fuga de electrones y producción de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) en las mitocondrias de los broilers más eficientes (bajo IC) en comparación con las mitocondrias de los animales menos eficientes (alto IC). Con ello, demostraron que las diferencias en la función mitocondrial estaban vinculadas a la variación en la eficiencia alimentaria.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que las diferencias en la eficiencia alimentaria también pueden estar causadas por variaciones en la composición de la ganancia de peso. Por ejemplo, Ferrell y Jenkins (1998) observaron que las diferencias en la tasa de deposición de agua, proteína y grasa influyeron en el ritmo de crecimiento de los animales, principalmente porque la grasa tiene más densidad energética que la proteína o el agua. Así, la deposición del mismo peso de tejido magro (proteína) y tejido graso implica diferentes costes energéticos.

Sin embargo, aunque se requiere mayor gasto de energía para la deposición de grasa que de proteína (debido a la gran cantidad de agua asociada al tejido magro), la eficiencia de utilización de los nutrientes para la deposición de grasa se encuentra entre el 70-95%, mientras que para la deposición de proteína varía entre el 40-50% (Owens *et al.*, 1995; Caton *et al.*, 2000; Herd y Arthur, 2009), debido, principalmente, al gasto energético asociado al *turnover* proteico. Por todo ello, cualquier variación en la composición de la ganancia y en la composición corporal, puede influir la eficiencia de utilización de los nutrientes.

4.2.4. Actividad física

La actividad física es una de las principales funciones no productivas de los animales. Es bien sabido que, como resultado de las diferencias en el gasto energético asociado a la actividad física, se producen variaciones en la producción de calor y, por tanto, en la energía disponible para el mantenimiento y crecimiento. En rumiantes, los principales mecanismos asociados al gasto energético por esfuerzo físico incluyen el

trabajo empleado en comer/alimentarse, en la rumia y en la locomoción (Herd y Arthur, 2009).

El efecto de la actividad física sobre la eficiencia alimentaria ha sido ampliamente estudiado en gallinas ponedoras. Braastad y Katle (1989) y Luiting *et al.* (1991) encontraron una mayor actividad física en los animales seleccionados para un alto RFI en comparación con los de bajo RFI. Por su parte, Morrison y Leeson (1978) observaron que los animales más eficientes empleaban más tiempo en descansar y menos en estar de pie o en comer que los animales menos eficientes, permitiéndoles ahorrar energía que podía ser empleada para la producción.

En diversos estudios realizados en cerdos, se observó una menor actividad física en los animales más eficientes (con bajo RFI) (Meunier-Salaün *et al.*, 2014; Gilbert *et al.*, 2017). De hecho, De Haer *et al.* (1993) estimaron en un 44% la variación en el RFI que podía ser atribuida a la actividad empleada en alimentarse. En el ganado vacuno, también se ha establecido una correlación fenotípica de 0,32 entre el RFI y la actividad física diaria determinada empleando podómetros, explicando el 10% de la variación en el RFI (Richardson *et al.*, 1999).

4.2.5. Termorregulación

Es bien sabido que las condiciones ambientales como la temperatura o la humedad relativa extrema pueden inducir estrés por calor o frío, influyendo en el consumo de alimento y en el metabolismo general del animal (Rhoads *et al.*, 2009). La temperatura es el factor ambiental más importante que afecta la eficiencia global de alimentación de la granja. En animales alimentados *ad libitum*, los cambios en la producción o en la pérdida de calor son mecanismos esenciales para mantener la temperatura corporal dentro de un rango fisiológicamente seguro bajo condiciones de estrés por frío o calor (Renaudeau *et al.*, 2012). La ruta principal para la pérdida de energía en los rumiantes es la pérdida de calor por evaporación, a través del intercambio de calor en los procesos respiratorios (Blaxter, 1962).

Cuando la temperatura ambiental está por encima o por debajo de la zona de confort térmico (15 a 25°C para el ganado en crecimiento; NRC, 1981), la eficiencia y, por lo tanto, el rendimiento productivo del animal se ven comprometidos bien porque disminuye la ingestión, bien porque los nutrientes se desvían del fin productivo para mantener una temperatura corporal segura. El estrés térmico por calor, definido como el

resultado de un balance negativo entre la energía disipada y el calor producido por el animal (St-Pierre *et al.*, 2003), tiene un impacto negativo en una variedad de características productivas que incluyen la producción de leche, el crecimiento, la reproducción y las características de la canal, además de poner en peligro el bienestar y la salud animal (Baumgard y Rhoads, 2012).

En condiciones de estrés térmico, se producen diversas respuestas fisiológicas como estrategia para mantener la temperatura corporal óptima. El aumento de la temperatura ambiental eleva la frecuencia respiratoria y la ingesta de agua (Mallonee *et al.*, 1985), reduce la motilidad intestinal, la rumia, las contracciones ruminales (Attebery y Johnson, 1969) y deprime la ingestión (Baile y Forbes, 1974; Warren *et al.*, 1974). Así, frente al estrés térmico por calor, comienza una reducción en la ingestión voluntaria de MS, puesto que de esta forma se disminuye el calor generado por la fermentación ruminal y el metabolismo corporal (Farooq *et al.*, 2010). Además, se produce un aumento del gasto de energía debido al aumento del jadeo y la sudoración para reestablecer la homeotermia en el animal. Esto da lugar a un incremento de las necesidades energéticas de mantenimiento, afectando negativamente al balance energético del animal (Baumgard y Rhoads, 2012; Beretta *et al.*, 2013).

En este sentido, Fox *et al.* (1988) observaron en el ganado vacuno una reducción del 10% en el consumo de MS cuando la temperatura ambiente se situó entre 25-30°C, así como un incremento del 7 al 18% en la energía neta de mantenimiento, dependiendo de la severidad del estrés por calor. Por otra parte, si los animales se mantienen a baja temperatura ambiente también aumentan sus necesidades energéticas de mantenimiento, debido al incremento de la producción y de las pérdidas de calor (McDonald *et al.*, 2013).

Sin embargo, un bajo rendimiento productivo relacionado con el estrés térmico también se puede atribuir a un efecto directo de la temperatura ambiente (independientemente de la ingestión de alimento) en la fisiología reproductiva, la salud y el metabolismo energético, así como en la deposición de grasa y proteína (Renaudeau *et al.*, 2012). De hecho, la respuesta al estrés por calor altera notablemente el metabolismo de los carbohidratos, los lípidos y las proteínas independientemente de la reducción en la ingesta de alimento (Baumgard y Rhoads, 2012). Estos autores observaron una alteración de la expresión de genes implicados en la gluconeogénesis hepática, un aumento de la glucólisis e hipoglucemia, así como una reducción de los

procesos lipolíticos y la movilización de grasas en los animales sometidos a estrés por calor, lo que se asoció al aumento de los niveles circulantes de insulina. Además, encontraron un mayor catabolismo de la proteína del músculo esquelético, lo que podría ser una estrategia con el fin de aportar precursores para la gluconeogénesis. Estos cambios en la partición y utilización de los nutrientes podrían ser mecanismos de adaptación empleados para priorizar el mantenimiento de la eutermia.

Por otra parte, varios autores (Liu *et al.*, 2009; Pearce *et al.*, 2013) observaron, en cerdos, que el estrés por calor produce alteraciones morfológicas y fisiológicas a nivel de la mucosa del intestino delgado (principal responsable de la absorción de nutrientes), como la reducción de la longitud de las vellosidades intestinales o la profundidad de las criptas, así como una disminución de la integridad de la barrera intestinal (con el consiguiente aumento de la endotoxemia y respuesta inflamatoria), afectando, por tanto, el rendimiento productivo y la eficiencia alimentaria de los animales.

4.2.6. Otros: estado de salud y bienestar animal

Es obvio que la salud juega un papel importante en la ingestión y en la eficiencia con que los animales utilizan el alimento. De hecho, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2015) ha estimado que el 20% de la producción animal se pierde debido a la existencia de animales no saludables o enfermos. Esto es debido a que la respuesta inmunológica frente a agentes patógenos es muy costosa en términos de energía, por lo que los recursos nutricionales dirigidos hacia esta función van en detrimento de otras como el crecimiento (Rauw, 2012). En este contexto, Knap (2005) define la robustez de un animal como “la capacidad de combinar un alto potencial de producción (crecimiento o reproductivo) con la resistencia/resiliencia a factores estresantes, lo que permite la expresión de un alto potencial de producción en una amplia variedad de condiciones ambientales”. Por lo tanto, es fundamental comprender los factores que modulan la respuesta inmunitaria con el fin de aumentar la eficiencia alimentaria y el rendimiento productivo de los animales (Animal Task Force, 2013).

No obstante, y a pesar de lo comentado anteriormente, en un estudio reciente, Cantalapiedra-Hijar *et al.* (2018) señalan como principales y verdaderos determinantes de las variaciones en la eficiencia alimentaria (RFI) al metabolismo energético, el *turnover* proteico y la función mitocondrial. Por el contrario, aquellos factores

relacionados con la ingestión y la digestión (tales como la digestibilidad, el microbioma ruminal, las emisiones de metano o el comportamiento alimentario) parecen estar asociados con el RFI principalmente porque afectan a la ingestión de MS, pero son considerados determinantes menores de la variabilidad animal en la eficiencia alimentaria. Por tanto, parece interesante determinar qué ocurre cuando se comparan animales alimentados al mismo nivel de ingestión, por ejemplo, mediante la clasificación de los animales en función de la ganancia residual (RG).

En cualquier caso, hay que tener en cuenta que las estrategias nutricionales para aumentar la eficiencia alimentaria podrían afectar negativamente otros caracteres productivos, como el crecimiento, la calidad de carne, la fertilidad, la longevidad (vida productiva), la robustez e incluso caracteres relacionados con el comportamiento, la salud, etc. (Rauw *et al.*, 1998). Por ello, el conocimiento de todos estos factores es importante para diseñar las mejores estrategias productivas con el fin de aumentar el rendimiento general de la explotación.

5. Programación metabólica, epigenética y restricción alimentaria

La programación metabólica es un campo que ha despertado gran interés y va adquiriendo cada día más importancia en el ámbito de la nutrición, tanto humana como animal. Se puede definir la programación metabólica (o programación del desarrollo) como un "proceso adaptativo" que se produce en respuesta a un estímulo adverso durante periodos críticos del desarrollo, como la subnutrición pre- y posnatal. Este proceso fisiológico de adaptación temprana puede tener impacto a largo plazo al programar la expresión de genes y, por ende, el fenotipo, provocando cambios permanentes en la fisiología y el metabolismo del organismo, de manera que continúa expresándose incluso en ausencia del estrés que lo inicia (Lucas, 1998; Patel y Srinivasan, 2002; Meyer *et al.*, 2012). El concepto de programación metabólica fetal surge por primera vez a principios de la década de 1990. Sobre la base de una convincente evidencia epidemiológica, Barker *et al.* (1993a,b) y Barker (1995a,b) formularon la hipótesis de que los eventos fetales y perinatales, como la desnutrición materna, son fundamentales para determinar el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas crónicas en la edad adulta, tales como la obesidad, la diabetes o patologías cardiovasculares, especialmente en condiciones de sobreaporte energético. Este conjunto de alteraciones se conoce con el nombre de *síndrome metabólico*.

Se demostró que, bajo condiciones de malnutrición en las primeras fases del desarrollo, se ponen en marcha mecanismos de ahorro nutricional en el individuo en crecimiento (hipótesis del fenotipo ahorrador) y se desencadenan una serie de adaptaciones metabólicas inapropiadas (*Predictive Adaptive Response Hypothesis*). Estas respuestas adaptativas tienen lugar en periodos críticos del desarrollo, durante el periodo fetal y posnatal (Hales y Barker, 2001; Silveira Rodríguez *et al.*, 2007). Así, una de las primeras consecuencias a largo plazo es la producción de cambios permanentes en el metabolismo de la glucosa y la insulina, como una capacidad reducida para la secreción de insulina (por la alteración del páncreas endocrino) y la resistencia a la insulina, factores determinantes en el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Hales y Barker, 2001; Hales y Barker, 2013).

Estas observaciones permitieron concluir que las alteraciones en la nutrición durante la vida fetal y perinatal estaban vinculadas a diversos problemas de salud durante la edad adulta, lo que se conoce como el paradigma del origen de la salud y la enfermedad durante el desarrollo (DOHaD, *developmental origins of health and disease*, y antiguamente denominada *la Hipótesis de Barker*) (Gluckman y Hanson, 2006; Sinclair *et al.*, 2016). Esta hipótesis postula que la nutrición en las etapas más tempranas de la vida, así como otros factores ambientales (p. ej., estrés o exposición a químicos ambientales) tienen una influencia crítica sobre el organismo, ya que pueden condicionar el desarrollo a lo largo de toda la vida, afectando a largo plazo la salud de un individuo y aumentando el riesgo a padecer determinadas enfermedades (Barker, 2007; Wadhwa *et al.*, 2009; Heindel *et al.*, 2015).

Un concepto ligeramente diferente del de programación metabólica es el de epigenética, que actualmente se presenta como una serie de mecanismos con un papel clave en la programación metabólica fetal y perinatal (Langley-Evans, 2006; Bernal y Jirtle, 2010; Petronis, 2010; Bouchard, 2013). El término fue acuñado por primera vez por Conrad Waddington en 1942 para referirse a “la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos, que dan lugar al fenotipo” (Waddington, 2012). Actualmente, el concepto ha evolucionado y se define la epigenética como “el estudio de cambios heredables (por mitosis o por meiosis) en la función génica que se producen sin un cambio en la secuencia del ADN y que son potencialmente reversibles” (Holliday, 2002; Bonasio *et al.*, 2010). En definitiva, se trata del conjunto de todos aquellos eventos no genéticos que afectan al desarrollo del

individuo y que no se basan en cambios en la secuencia de ADN, es decir, que no son cambios mutacionales.

Hay que tener en cuenta que las funciones de los genes pueden ser de dos tipos:

- transmisión del material genético de generación en generación, lo que sería el campo de la genética;
- expresión diferencial durante el desarrollo de un organismo desde la fertilización del óvulo hasta la etapa de adulto, lo que sería el campo de la epigenética.

Estos patrones de expresión génica son estables y se transmiten a las células hijas durante el proceso de desarrollo, pudiendo perpetuarse incluso en ausencia del estímulo inicial. Así, las alteraciones epigenéticas pueden conservarse en el tiempo a través de sucesivas generaciones por su transmisión a la descendencia (Bird y Macleod, 2004; Morgan y Whitelaw, 2008). Por tanto, el epigenoma se puede considerar como una interfaz entre el genoma y el medio ambiente que es fundamental para la generación de fenotipos y su estabilidad a lo largo de la vida (Lee, 2015).

Los principales mecanismos que rigen la regulación epigenética de la expresión génica son: la metilación de ADN (por modificación covalente de los residuos de citosina-5'), las modificaciones postraduccionales de las colas de histonas y los cambios en el perfil de expresión del microARN (miRNAs, ARNs no codificantes) (Jirtle y Skinner, 2007; Szyf, 2009; Bonasio *et al.*, 2010; Lee, 2015). Estas marcas epigenéticas son críticas para la diferenciación celular durante el desarrollo, así como la diferenciación de los distintos tejidos (Bird, 2002). El estado epigenético que se establece durante las etapas de programación persiste en algunos loci durante la vida de un individuo (Lee, 2015).

Estos mecanismos epigenéticos brindan la posibilidad de una intervención nutricional en periodos críticos del desarrollo, gracias a la capacidad de modular la expresión génica mediante modificaciones nutricionales, así como la posibilidad de transmitir estos patrones de expresión génica a la descendencia (regulación epigenética) (Silveira Rodríguez *et al.*, 2007). Así, por ejemplo, se ha demostrado que el silenciamiento progresivo del gen *Pdx1* en el páncreas precede al inicio clínico de la diabetes en ratas nacidas tras un retraso del crecimiento intrauterino (Park *et al.*, 2008). En este sentido, Vickers *et al.* (2005), Gluckman *et al.* (2007), Vickers *et al.* (2008) y

Ellis *et al.* (2014) observaron que la administración de leptina era capaz de revertir el fenotipo programado y, por tanto, los trastornos metabólicos observados en los hijos de ratas desnutridas.

En este contexto, un ejemplo ampliamente estudiado de programación metabólica negativa en la especie humana es el caso del “Invierno holandés del hambre” (Dutch Hunger Winter). Así, varias investigaciones pusieron de manifiesto que la subnutrición fetal, que tuvo lugar durante la restricción calórica materna debida a la Segunda Guerra Mundial, se asoció con un menor peso al nacimiento y el aumento de riesgo de aparición de determinadas enfermedades crónicas en la descendencia, tales como obesidad, enfermedad cardiovascular, dislipidemia, hipertensión, etc. (Roseboom *et al.*, 2011). Desde entonces, se han llevado a cabo multitud de estudios tanto en humanos como en diferentes modelos de especies animales, incluyendo los animales de producción. Así, numerosos estudios han puesto de manifiesto que la desnutrición temprana conduce a anormalidades metabólicas posteriores, como la obesidad, la intolerancia a la glucosa (GLU) y la resistencia a la insulina en humanos y ratas (Martorell *et al.*, 2001; González-Barranco y Ríos-Torres, 2004; Raatz *et al.*, 2005). De hecho, se ha demostrado en humanos que la tendencia a almacenar grasa abdominal podría ser consecuencia de una respuesta persistente a las condiciones adversas y fallo en el crecimiento durante la vida fetal y la infancia (Law *et al.*, 1992; Martorell *et al.*, 2001; González-Barranco y Ríos-Torres, 2004).

Respecto a los animales de producción, existen evidencias de que los factores de riesgo prenatales, incluyendo una subnutrición materna, pueden afectar a caracteres como el crecimiento posnatal, la eficiencia alimentaria, la producción de leche, la composición de la canal, el bienestar animal y el potencial reproductivo (Bach, 2012; Bell y Greenwood, 2016a,b; Sinclair *et al.*, 2016). En este sentido, se ha demostrado en varias especies de mamíferos que la nutrición pre-y posnatal temprana tienen un papel clave en el metabolismo de los lípidos y la glucosa a largo plazo y, por lo tanto, pueden tener consecuencias en el rendimiento productivo del animal (Bach, 2012). En el caso de la especie ovina, Gardner *et al.* (2005) observaron que la subnutrición prenatal, especialmente durante la última fase de la gestación, afecta al metabolismo de la descendencia en la edad adulta y, en particular, a la homeostasis glucosa-insulina, provocando intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. Por otro lado, también se ha demostrado en rumiantes que la falta de nutrientes durante la gestación reduce la

formación y el tamaño de las fibras musculares y disminuye el número de adipocitos intramusculares en la descendencia, afectando negativamente al desarrollo de la masa muscular y, por ende, al rendimiento (Du *et al.*, 2010).

Sin embargo, en los animales de producción, los mecanismos subyacentes a la programación metabólica son todavía bastante desconocidos en comparación con otras especies como la humana o los animales de laboratorio, principalmente debido a las dificultades técnicas (Sinclair *et al.*, 2016; Chavatte-Palmer *et al.*, 2018). El conocimiento de los mecanismos de regulación implicados en estos procesos permitirá el desarrollo de estrategias para mejorar el rendimiento productivo de los animales.

La mayoría de las investigaciones sobre programación del desarrollo se han centrado en el efecto de la nutrición materna durante la gestación sobre la eficiencia en la descendencia, sugiriendo que la eficiencia alimentaria durante la fase de crecimiento puede ser programada en el útero (Corner *et al.*, 2008; Kenyon *et al.*, 2009; Funston *et al.*, 2010; Bell y Greenwood, 2016a,b). Así, se ha demostrado en diferentes especies que la nutrición recibida por la madre durante la gestación puede modificar la expresión génica en diferentes órganos y tejidos de la descendencia, afectando a la utilización digestiva y metabólica de los nutrientes.

En cambio, existen pocos estudios acerca de los efectos de la nutrición durante las primeras etapas de vida, la mayor parte realizados en la especie humana (Davis, 2001; Harder *et al.*, 2005; Koletzko *et al.*, 2012; Plagemann *et al.*, 2012), demostrándose que la nutrición posnatal (tanto a nivel cuantitativo como cualitativo) juega un papel crítico en la programación a largo plazo de la salud y la enfermedad. En un estudio realizado en broilers, Zhan *et al.* (2007) observaron que la restricción de alimento afectó severamente al crecimiento y al metabolismo lipídico en el periodo inicial. Además, los resultados de crecimiento obtenidos indican que la restricción temprana de alimentación podría haber inducido una programación metabólica prolongada en los broilers y conducir a la obesidad en la edad adulta.

La principal hipótesis es que la disponibilidad y fuente de nutrientes durante las primeras etapas de vida pueden modular las rutas fisiológicas celulares de crecimiento, desarrollo, maduración del sistema inmunitario y endocrino, así como el gasto energético (Kenéz *et al.*, 2018). Por tanto, es de esperar que los mecanismos epigenéticos desempeñen un papel importante en el mantenimiento de los efectos a

largo plazo de la nutrición antes del destete, provocando alteraciones estables en el fenotipo como una forma de impronta metabólica (Bartol *et al.*, 2013).

5.1. Herramientas -ómicas y eficiencia de producción

Gracias a los avances realizados en bioinformática, en los últimos años se ha producido un notable desarrollo de las llamadas tecnologías “ómicas” de alto rendimiento (*High-throughput “omics” technologies*, HTO) en todos los campos de la biología, encabezando el progreso de la era de la biología de sistemas (Suravajhala *et al.*, 2016).

Las llamadas herramientas “ómicas” constituyen un grupo de técnicas innovadoras que permiten identificar con mayor precisión genes y rutas metabólicas asociadas a determinadas características o fenotipos (Ruchat *et al.*, 2014; Tizioto *et al.*, 2015). Estos métodos son valiosas herramientas para el estudio de caracteres complejos en las especies ganaderas, como la eficiencia alimentaria, ganancia de peso, fertilidad y resistencia a enfermedades (Kadarmideen, 2014). Por lo tanto, en la presente tesis, el uso de estas técnicas se plantea como una herramienta para mejorar la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a los distintos efectos desencadenados por la restricción de alimento durante la lactancia de los corderos.

Bajo este nombre de “ómicas” se engloban diferentes disciplinas, como la genómica (estudio del genoma y función de los genes), la epigenómica (estudio de cambios en la expresión génica producidos por modificaciones epigenéticas), la transcriptómica (estudio del ARNm y expresión génica), la proteómica (estudio de la estructura, función, localización e interacción de proteínas) o la metabolómica (estudio de los metabolitos) (figura 5). A estas tres últimas también se las agrupa bajo la denominación de “genómica funcional”, ya que estudian los productos de la expresión de los genes (Silveira Rodríguez *et al.*, 2007; Farfán y Torres, 2018).

Todas las “ómicas” se basan en el análisis de un gran volumen de datos y, por lo tanto, se valen de la bioinformática y de técnicas rápidas y automatizadas de alto rendimiento. Como principal inconveniente, por tanto, hay que tener en cuenta que la mayoría de estas técnicas requieren de una infraestructura y equipamiento de alto nivel y coste económico (Ohashi *et al.*, 2015). Además, la integración de estos datos multiómicos sigue siendo un desafío importante para comprender mejor la programación metabólica asociada a determinados procesos fisiológicos o patológicos,

proporcionando un enfoque holístico de las rutas moleculares implicadas en los diferentes caracteres (Suravajhala *et al.*, 2016). En cualquier caso, es importante que los estudios -ómicos se vinculen con el “dogma central de la biología molecular”: pasando de los genes a las enfermedades o características fenotípicas a través de los procesos de transcripción (a ARNm) y traducción (proteínas), así como las reacciones enzimáticas y rutas metabólicas (metabolitos que actúan como sustratos y productos en dichas reacciones) (Kadarmideen, 2014).

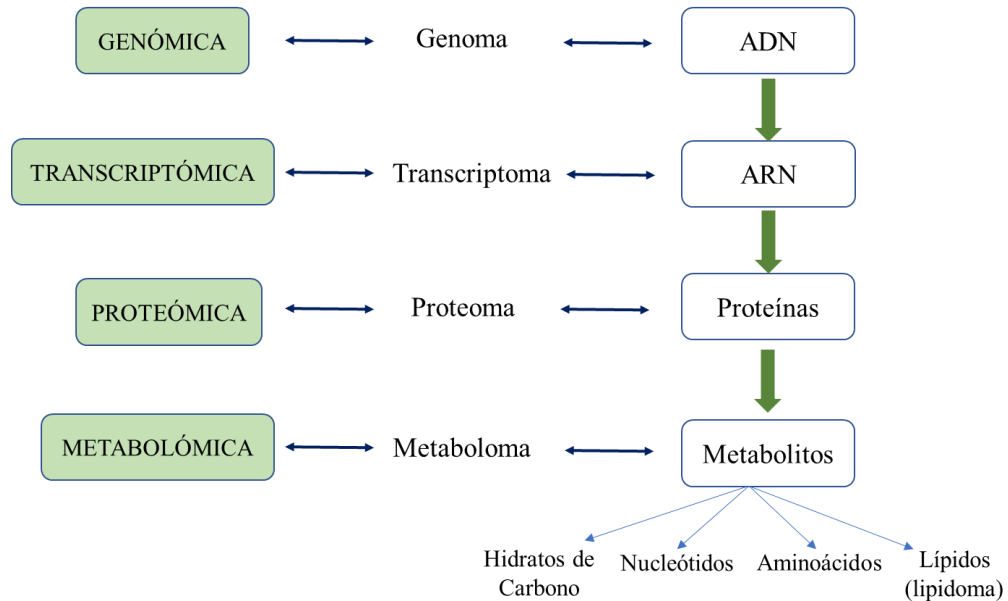


Figura 5. Esquema de las principales herramientas moleculares empleadas en la actualidad, así como sus elementos reguladores y productos.

A continuación, explicaremos con más detalle estas cuatro herramientas -ómicas, aunque, para el desarrollo de esta tesis, solo se han empleado las agrupadas bajo el epígrafe de genómica funcional (transcriptómica, proteómica y metabolómica).

5.1.1. Genómica

La palabra genómica fue propuesta por primera vez por Thomas H. Roderick en 1986 para describir la disciplina genética cuyo objetivo es mapear y secuenciar el genoma. Comprende el estudio del contenido, organización, función y evolución de la información genética en un genoma completo (conjunto de todo el ADN presente en un organismo) (Hieter y Boguski, 1997).

El estudio del genoma completo de un individuo (tanto de humanos como de varias especies animales) se remonta a la década de los 90, cuando la atención se centró

en la identificación de variantes genéticas utilizando los estudios de asociación del genoma completo (*Genome-wide association study*, GWAS), basados en microarrays o chips con decenas de miles de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Estos estudios se emplean en la investigación genética para asociar variaciones genéticas específicas con determinadas enfermedades o caracteres. Los GWAS suelen centrarse en asociaciones entre los SNPs y rasgos como las principales enfermedades. Así, en un GWAS, cada SNP se prueba estadísticamente para determinar la importancia de la asociación con el rasgo/fenotipo de interés (Kadarmideen, 2014; Suravajhala *et al.*, 2016).

Sin embargo, apenas existen evidencias acerca de la aportación de estas herramientas a la mejora de nuestra comprensión de las vías moleculares que están involucradas en determinadas enfermedades y rasgos complejos (Suravajhala *et al.*, 2016). Por ello, a lo largo de los últimos años han surgido otras técnicas más avanzadas con el objetivo de caracterizar dichos mecanismos moleculares, como las técnicas de secuenciación masiva o de nueva generación (NGS, *Next Generation Sequencing*), capaz de secuenciar millones de pequeños fragmentos de ADN en paralelo (Behjati y Tarpey, 2013; Ohashi *et al.*, 2015). El uso de esta tecnología ha reducido drásticamente el tiempo y coste necesarios para la secuenciación (Ohashi *et al.*, 2015). De esta forma, gracias al acceso a estas técnicas de secuenciación masiva de alto rendimiento, la genómica ha sido la tecnología -ómica de mayor desarrollo (Farfán y Torres, 2018).

Por último, dentro del campo de la genómica, es preciso mencionar la rama de la nutrigenómica, disciplina que estudia la regulación de los genes por la dieta (en los procesos de transcripción, traducción y metabolismo), brindando la posibilidad de una intervención nutricional en periodos críticos del desarrollo y la capacidad de modificar la susceptibilidad genética a ciertas enfermedades a través de la alimentación. Las interacciones entre genes (genoma), nutrientes y rutas metabólicas son complejas y variadas, divididas en 3 grandes categorías: variaciones genéticas y necesidades nutritivas, interacciones directas nutriente-gen e interacciones epigenéticas (Silveira Rodríguez *et al.*, 2007).

5.1.2. Transcriptómica

La transcriptómica se define como la detección o cuantificación de los ARN (transcritos) presentes en una célula o tejido, que refleja los genes que se están

expresando en un momento determinado. Así, la cuantificación del transcriptoma (constituido por el ARN total contenido en una célula u organismo) permite comparar perfiles de expresión génica en diferentes situaciones (Farfán y Torres, 2018).

La regulación positiva y negativa de los genes da como resultado diferentes niveles de proteínas y metabolitos que inducen cambios fenotípicos en el animal. Por lo tanto, una mejor comprensión de la regulación de los genes debería proporcionar información sobre el funcionamiento biológico y la detección de genes que son importantes en determinadas enfermedades o rasgos de producción (Suravajhala *et al.*, 2016).

Existen varias técnicas que permiten desarrollar estudios de transcriptómica, como la PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR), los microarrays de expresión o chips de ADN y la secuenciación de ARN (Farfán y Torres, 2018). Sin embargo, dadas las limitaciones de la RT-qPCR y los microarrays (menor precisión, rango limitado de detección, mayor coste, heterogeneidad metodológica, menor reproducibilidad y poder estadístico, requieren métodos normalizados para comparaciones entre experimentos, no permiten el metaanálisis de datos debido a la variabilidad de protocolos experimentales, etc.; Gironella, 2010; Malone y Oliver, 2011; Kadarmideen, 2014), la tecnología más utilizada en la actualidad son las técnicas de secuenciación masiva o de nueva generación (NGS). Cuando se aplica la tecnología NGS para secuenciar directamente el ARN (principalmente ARN mensajero -ARNm-, pero también ARN no codificante -ARNnc-), se denominan RNA-seq. El primer paso, tras la extracción del ARN, es la preparación de las genotecas de ADN complementario y la secuenciación del transcriptoma. Después, tiene lugar la cuantificación de los transcritos y, por último, el análisis de expresión diferencial (Conesa *et al.*, 2016).

Esta técnica presenta un enfoque cuantitativo en el sentido de que determina y cuantifica directamente todo el ARNm, con lo que se obtienen los niveles de expresión de ARN en células o tejidos con mayor precisión que los microarrays, que proporcionan una cuantificación relativa de la expresión génica, ya que se compara entre diferentes muestras (p. ej., tratamientos) la cantidad relativa o relación del ARNm de un gen específico respecto a la cantidad de ARNm de un gen constitutivo (control endógeno) (Kadarmideen, 2014; Ohashi *et al.*, 2015). Otra de las ventajas del RNA-seq es su capacidad de detectar productos de la transcripción desconocidos, como nuevos transcritos y variantes genéticas (Ohashi *et al.*, 2015; Suravajhala *et al.*, 2016).

La mayoría de los estudios de transcriptómica se centran en la detección y anotación de genes expresados diferencialmente (DE) y genes co-expresados, así como la construcción de redes de genes (Kadarmideen, 2014). El enfoque más común para analizar los datos de expresión es comparar los niveles de expresión entre dos estados (p. ej., animales sanos *versus* animales enfermos o de alta productividad *versus* de baja productividad), también llamados análisis de expresión diferencial (Kadarmideen y Reverter, 2007). En este contexto, diversos estudios se han centrado en la detección de genes diferencialmente expresados (DE) para diversos caracteres/rasgos de producción y salud en diferentes especies.

Lkhagvadorj *et al.* (2010) estudiaron el efecto de una restricción calórica y la selección de cerdos para el RFI en el perfil transcriptómico del hígado y de la grasa subcutánea. Observaron una disminución de la expresión de genes implicados en la lipogénesis y la esteroidogénesis (p. ej., *FASN*, *DHCR7*), tanto en el hígado como en el tejido adiposo de los cerdos restringidos, así como una disminución de la expresión de genes que participan en el metabolismo de los lípidos (p. ej., *GPD2*, *ALDH5A1*) tanto en los animales más eficientes (bajo RFI), como en aquellos sometidos a una restricción calórica. Estos autores sugieren que estas diferencias podrían representar un mecanismo de conservación de la energía, que se manifestaría tanto en respuesta a la restricción calórica como en los cerdos con una alta eficiencia alimentaria. Por otro lado, la restricción calórica también aumentó la expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria (p. ej., *TNF*, *CD4*, *CD8A*) y se produjo una alteración de las rutas apoptóticas en el tejido adiposo (p. ej., sobreexpresión del gen *CDKN1A* y menor expresión del gen *FADD*).

Por el contrario, Lee *et al.* (2015), comparando dos grupos de broilers seleccionados para un alto o bajo RFI, observaron una mayor expresión de genes involucrados en el metabolismo y transporte de lípidos, colesterol y ácidos biliares (p. ej., *AADAC*, *APOH*, *CYP2C9*) (aumento de la oxidación de la grasa de la dieta y mayor eficiencia en el transporte de ácidos grasos desde el intestino) en el duodeno de los animales con un bajo RFI, así como diferencias en el metabolismo de las proteínas (sobreexpresión de genes involucrados en la síntesis de proteínas; p. ej., *ATXN3*, *SERPINE2*), la división y proliferación celular (p. ej., sobreexpresión del gen *MAP2K4*) entre ambos grupos. Además, encontraron una sobreexpresión de genes que reducen el apetito (p. ej., *CD36*, *PPAR α* , *GCG*), así como mayor estrés oxidativo, apoptosis y daño

al ADN (p. ej., mayor expresión del gen *OSGIN1*) en los animales con menor RFI (más eficientes). Estos resultados sugieren que la mayor eficiencia alimentaria de los animales seleccionados para un bajo RFI se logra a través de una reducción en la ingestión sin efecto adverso sobre la ganancia de peso.

En un estudio del perfil transcriptómico sanguíneo de cerdos, Jégou *et al.* (2016) observaron un aumento de la expresión de genes asociados con el proceso de elongación de la cadena polipeptídica (p. ej., *RPSA*, *EEF1A1*, *RPL14*) en los cerdos seleccionados para un bajo RFI, lo que podría reflejar una mayor síntesis de proteínas en estos animales. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Vincent *et al.* (2015) en el análisis transcriptómico del músculo de cerdas, con una mayor expresión de genes involucrados en la síntesis de proteínas (p. ej., *EEF1A1*, *EIF6*, *PRMT3*) en cerdas con bajo RFI. Además, Jégou *et al.* (2016) también observaron una disminución de la expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria (p. ej., *TLR1*, *TLR2*, *HLA-C*), regulación de la respuesta inflamatoria (p. ej., *SERPINF1*, *CD24*, *IL10*) y procesos anti-apoptóticos (p. ej., *BECN1*, *SPHK1*, *CLU*), sugiriendo que la selección de cerdos para el RFI afecta negativamente el estado inmunitario y los mecanismos de defensa de estos animales.

El análisis del perfil transcriptómico hepático de toros seleccionados para un alto o bajo RFI también puso de manifiesto diferencias en rutas tan importantes como las implicadas en el crecimiento y la proliferación celular, la síntesis de proteínas, el metabolismo de los lípidos y carbohidratos, el metabolismo y detoxificación de xenobióticos, y la señalización, ensamblaje y organización celular (Chen *et al.*, 2011).

Por otra parte, en un estudio realizado durante la lactación de vacas (Akbar *et al.*, 2013), la restricción de alimento alteró el transcriptoma hepático incrementando la expresión de genes asociados con la gluconeogénesis (p. ej., *PC*, *PDK4*), la inflamación (p. ej., *SAA3*) y la señalización celular (p. ej., *ADIPOR2*). En cambio, se inhibieron funciones relacionadas con la biosíntesis de colesterol (p. ej., *SC4MOL*, *HMGCS1*, *FDPS*) y la generación de energía por la cadena respiratoria mitocondrial (disminución de la expresión de genes implicados en la fosforilación oxidativa; p. ej., *NDUFA4*, *COX7A2*, *UQCRC2*, *NDUFS3*), como mecanismo de ahorro de energía. Además, mejoró el metabolismo del glutatión para contrarrestar el estrés oxidativo (aumento de la expresión de los genes *GPX3* y *GPX4*), probablemente provocado por la mayor

oxidación de los ácidos grasos no esterificados (NEFA) (resultado de la movilización de grasa), y por defectos en la cadena respiratoria mitocondrial (mayor fuga de electrones).

No obstante, existen pocos trabajos que hayan utilizado esta nueva tecnología en la especie ovina para el estudio de la eficiencia alimentaria. En este sentido, Zhang *et al.* (2019) observaron una mayor expresión en los corderos más eficientes (bajo RFI) de genes que participan en rutas del metabolismo energético (p. ej., *SPP1*, *FCGBP*, *PPARGC1A*, *ME1*) y una menor expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria (p. ej., *DQA*, *RFC3*, *RYR2*, *PTGER3*), proceso muy costoso desde el punto de vista energético.

5.1.3. Proteómica

La proteómica tiene como objetivo caracterizar y cuantificar el conjunto de proteínas presentes en una célula, tejido u organismo (proteoma) derivadas del transcriptoma (Farfán y Torres, 2018). Los estudios proteómicos implican tanto la identificación como la comparación cualitativa y cuantitativa de las proteínas acumuladas en diferentes condiciones, así como la caracterización de sus propiedades y funciones, utilizando, generalmente, técnicas de alto rendimiento a gran escala (HTO) (Haoudi y Bensmail, 2006).

La técnica de espectrometría de masas, en sus diferentes versiones, y la electroforesis bidimensional, han sido clave en los estudios proteómicos. Así, la mayoría de las técnicas utilizadas actualmente en proteómica incluyen diversos métodos de separación de péptidos y proteínas por afinidad (electroforesis en gel de una o dos dimensiones, o separación por cromatografía de una o dos dimensiones) antes del análisis por espectrometría de masas (MS) (Cristea *et al.*, 2004). Actualmente, una de las técnicas de espectrometría de masas de mayor impacto, junto con la ionización por electrospray, es la aplicación de MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) (Han *et al.*, 2008; Farfán y Torres, 2018), en la que los átomos o moléculas de una muestra son ionizados mediante una radiación láser, separados por su relación masa/carga (m/z) y posteriormente detectados y registrados (Yates, 1998; Han *et al.*, 2008). Por su parte, la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) permite la secuenciación de proteínas y péptidos y, por lo tanto, ha evolucionado como una herramienta indispensable para la identificación y caracterización de proteínas (Cristea *et al.*, 2004). Otras técnicas menos empleadas son

la cromatografía líquida (LC-MS), la cromatografía de gases (GC-MS) o los microarrays de proteínas (Yates, 1998; Cristea *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2008; Karpievitch *et al.*, 2010; Ohashi *et al.*, 2015).

A pesar de la escasez de estudios acerca de la relación del perfil proteómico con el rendimiento productivo en rumiantes, existen evidencias de que la expresión diferencial de proteínas está asociada con la expresión fenotípica de la eficiencia alimentaria.

Así, Lassiter *et al.* (2006) observaron mayores niveles de proteínas carboniladas en los linfocitos de broilers con una baja eficiencia alimentaria, indicando una mayor oxidación de proteínas y, por tanto, contribuyendo a una mayor disfunción y daño mitocondrial en estos animales. Resultados similares se han encontrado en otros tejidos como el hígado, con una mayor oxidación de proteínas y estrés oxidativo en animales menos eficientes (Bottje *et al.*, 2004; Iqbal *et al.*, 2005). Asimismo, el estudio realizado por Grubbs *et al.* (2013) sugiere que los cerdos seleccionados para un bajo RFI podrían ser menos propensos al estrés oxidativo en comparación con los cerdos de alto RFI. En este trabajo, el perfil proteómico de las mitocondrias musculares de los cerdos menos eficientes indicó una mayor producción de radicales libres (ROS) (p. ej., mayor acumulación de la enzima citocromo P450 4A11), así como posibles modificaciones de las vías metabólicas que conducen al estrés oxidativo, el metabolismo y la reparación celular. Además, observaron una menor acumulación de proteínas implicadas en el ciclo de Krebs (p. ej., aconitasa hidratasa), lo que indica una menor producción de ATP y, por tanto, menor eficiencia en la utilización de los nutrientes.

Por su parte, Vincent *et al.* (2015) encontraron una menor abundancia de proteínas relacionadas con la oxidación mitocondrial (p. ej., aconitasa hidratasa, ATP sintasa subunidad α), así como una mayor abundancia de proteínas implicadas en la glucólisis (p. ej., fructosa-bifosfato aldolasa A y gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa, 2) en el músculo de cerdas seleccionadas para un bajo RFI. Además, estos autores observaron una menor acumulación de las proteínas antioxidantes en el músculo de estos animales (p. ej., peroxirredoxina 6), lo que atribuyeron a una menor producción de moléculas oxidativas. Estos resultados fueron corroborados por el análisis del transcriptoma, mostrando en conjunto un menor metabolismo oxidativo en el músculo de las cerdas más eficientes. Por todo ello, este podría constituir uno de los mecanismos biológicos que contribuyen a explicar las diferencias en la eficiencia alimentaria, puesto

que los animales que sufren menos estrés oxidativo tienen la capacidad fisiológica de dirigir más energía de la dieta hacia el crecimiento, ya que se requiere menos energía para la reparación celular (Grubbs *et al.*, 2013).

Por otro lado, Kuhla *et al.* (2009) estudiaron el efecto de la restricción de alimento en vacas de leche sobre el perfil proteómico del hígado. Observaron una menor acumulación en el grupo restringido de proteínas asociadas con la oxidación de ácidos grasos (p. ej., acil-CoA deshidrogenasa), la glucólisis (p. ej., 6-fosfofructoquinasa, enolasa 1), la transferencia de electrones (p. ej., Citocromo B5) y la degradación de proteínas (p. ej., proteínas de choque térmico de 70 KDa, glutamato deshidrogenasa 1), así como una mayor acumulación de enzimas del ciclo de la urea (p. ej., arginasa-1, argininosuccinato sintetasa), proteínas transportadoras de ácidos grasos o colesterol (p. ej., apolipoproteína A1, proteína transportadora de esteroides 2) y un inhibidor de la glucólisis (paratimosina). Sus resultados demuestran que, tras un periodo de restricción de alimento, se reduce la actividad glucolítica y disminuye la degradación de los ácidos grasos. Estos autores también observaron que la restricción de alimento disminuyó la capacidad del hígado para contrarrestar el estrés oxidativo, debido a la menor acumulación en los animales restringidos de la enzima peroxirredoxina 6, que reduce los niveles de peróxido de hidrógeno.

Debido a que la mayoría de las funciones de los genes son realizadas por proteínas, la proteómica proporciona un mejor enfoque para entender las funciones celulares de los genes. Sin embargo, al igual que en el caso de la transcriptómica, apenas existen estudios del efecto de la restricción de alimento sobre el perfil proteómico en rumiantes, así como de la relación entre la eficiencia alimentaria y la acumulación diferencial de proteínas. Por el contrario, la mayoría de los estudios se han centrado en la identificación de determinados biomarcadores contra las principales enfermedades, como la mastitis o las enfermedades respiratorias en el caso del ganado vacuno, y las parasitosis gastrointestinales en el caso de los pequeños rumiantes (Ceciliani *et al.*, 2014).

5.1.4. Metabolómica

La metabolómica tiene como objetivo detectar, identificar y cuantificar el conjunto de los metabolitos (productos intermediarios del metabolismo) presentes en un determinado sistema biológico. Por ello, la naturaleza de las moléculas que se analizan

en estos estudios es más compleja, encontrándose lípidos, carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos, vitaminas o xenobióticos, entre otros (Ohashi *et al.*, 2015; Suravajhala *et al.*, 2016; Farfán y Torres, 2018). Además, hay que tener en cuenta que en el metaboloma de un individuo podemos encontrar tanto metabolitos endógenos (producidos de manera natural por un organismo, como ácidos grasos, aminoácidos, azúcares, etc.) como exógenos (provenientes de la interacción con el exterior, tales como fármacos, contaminantes ambientales, aditivos alimentarios, toxinas y otros xenobióticos) (Silveira Rodríguez *et al.*, 2007).

Debido a que el metaboloma es la consecuencia de los cambios en la expresión de genes y en la actividad de las proteínas que codifican, los cambios en el metaboloma reflejan diferencias en los procesos bioquímicos y biológicos que ocurren en el organismo (Ohashi *et al.*, 2015; Farfán y Torres, 2018) y constituyen la última respuesta del organismo a alteraciones genéticas, químicas, ambientales, etc. (Pérez, 2018). La metabolómica supone, por tanto, el último eslabón de información de la cascada “ómica” (genoma → epigenoma → transcriptoma → proteoma → metaboloma → fenotipo). Por ello, esta técnica proporciona una oportunidad única para establecer las relaciones entre el genotipo y el fenotipo (Suravajhala *et al.*, 2016; Pérez, 2018).

Las dos metodologías más utilizadas para identificar y cuantificar metabolitos son la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS); esta última casi siempre acoplada a técnicas cromatográficas, como la cromatografía líquida (LC-MS) o la cromatografía de gases (GC-MS), y, en menor medida, a la electroforesis capilar (CE-MS) (Ohashi *et al.*, 2015; Vicente, 2015).

Asimismo, existen dos tipos básicos de estudios de metabolómica en función del método experimental utilizado: análisis dirigido, cuyo objetivo es la búsqueda y cuantificación de metabolitos concretos; y análisis no dirigido, que se ocupa del estudio del perfil metabolómico de las diferentes muestras y busca moléculas acumuladas diferencialmente entre grupos. En este caso, el análisis no se restringe a un grupo seleccionado de compuestos, lo que se pretende es analizar simultáneamente tantos metabolitos como sea posible para obtener una visión global del fenotipo o metabolismo de los grupos de interés (Ohashi *et al.*, 2015).

Para comprender los mecanismos fisiológicos subyacentes relacionados con el rendimiento productivo, se necesitan más estudios que relacionen el metabolismo de los

animales con distintos niveles de producción y crecimiento. La metabolómica proporciona una herramienta útil para lograr este objetivo, pero actualmente en rumiantes solo se dispone de una cantidad limitada de datos de metabolómica, centrados principalmente en enfermedades infecciosas (Basoglu *et al.*, 2016).

Así, al contrario que en el caso de la transcriptómica, hemos encontrado pocos trabajos que estudien el perfil metabolómico de los animales más y menos eficientes, así como el efecto de una restricción alimentaria sobre el metaboloma. En broilers, se han encontrado asociaciones entre el metaboloma sérico e intestinal y la eficiencia digestiva (Beauclercq *et al.*, 2018). La mayoría de los metabolitos estaban relacionados con el metabolismo de las proteínas y la utilización de los aminoácidos (p. ej., fenilalanina, prolina, metionina, valina, leucina), pero también, en el caso de los metabolitos del contenido intestinal, con el reciclado del amoníaco (p. ej., asparagina, histidina, aspartato, glutamina) y el ciclo de la urea (p. ej., fumarato, glutamato, alanina), poniendo de manifiesto la facilidad de los animales más eficientes de hidrolizar proteínas en el íleon, liberando una gran cantidad de aminoácidos.

Por otro lado, Zhou *et al.* (2016) investigaron los efectos a largo plazo de una dieta con bajo contenido de proteína sobre la composición microbiana y el perfil metabolómico en el contenido del ciego y del colon proximal del cerdo. Además de diferencias en rutas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos, observaron alteraciones en rutas asociadas con el metabolismo de la glucosa, tales como el ciclo de Krebs y el metabolismo del piruvato, sin afectar al crecimiento de los cerdos (GDP), la ingestión media diaria o la eficiencia alimentaria (IC).

En un estudio realizado con terneras, Kenéz *et al.* (2018) compararon las concentraciones de metabolitos plasmáticos entre animales alimentados *ad libitum* o restringidos durante parte del periodo de lactancia. Observaron, sobre todo, una menor concentración de acilcarnitinas (implicadas en el transporte mitocondrial de ácidos grasos para su oxidación y la consiguiente producción de energía) en el grupo restringido, tanto en la fase de ternera como en la de novilla. Sus resultados demuestran los efectos metabólicos a largo plazo de la restricción de alimento durante la lactancia sobre la función mitocondrial, probablemente debido a mecanismos epigenéticos.

Con todo ello, y dada la escasez de estudios, sobre todo en corderos, es importante elucidar el efecto de la restricción de alimento durante la fase de lactancia

sobre el perfil metabolómico en etapas posteriores, con el fin de descifrar las rutas reguladoras y funcionales que representan el puente entre el genotipo y el fenotipo. Así, los distintos perfiles metabólicos podrían reflejar asociaciones entre el manejo nutricional (diferentes estrategias nutricionales) y los perfiles de producción (Kenéz *et al.*, 2018).

6. Relación entre eficiencia alimentaria y calidad del producto (canal y carne)

En este punto, es preciso recordar que no se puede definir igual la calidad para toda la cadena productiva y comercializadora. Así, cuando se habla de calidad debemos diferenciar entre la calidad de la canal y la calidad de la carne.

Colomer-Rocher (1973) define la calidad de la canal como el “conjunto de características cuantitativas y cualitativas, cuya importancia relativa confiere a la canal una máxima aceptación y un mayor precio frente a los consumidores o frente a la demanda del mercado”. Los principales factores determinantes de la calidad de la canal son: el peso de la canal, el grado de engrasamiento, la morfología o estado de conformación y la composición de la canal (Delfa y Teixeira, 1998).

Por su parte, la calidad de la carne se define, según la FAO (2014) (*Food and Agriculture Organization*), en función de su composición (coeficiente magro-graso) y de otros atributos, tales como su color, olor, firmeza, jugosidad, ternura o sabor (propiedades organolépticas). Hay que tener en cuenta que la calidad nutritiva de la carne es objetiva, mientras que la calidad “como producto comestible”, tal y como es percibida por el consumidor, es muy subjetiva. Así, el valor óptimo de ciertos atributos, especialmente los organolépticos, puede tener un elevado componente geográfico y cultural. En cualquier caso, la calidad de la carne (especialmente sus propiedades organolépticas) es uno de los criterios que más influye, junto con el precio, en la decisión de compra del consumidor (Listrat *et al.*, 2016).

Existe una gran cantidad de factores que afectan a la calidad de la canal y de la carne de cordero, tanto intrínsecos, como la raza, especie, base genética, sexo, edad, peso al sacrificio, etc., como extrínsecos, entre los que cabe destacar la dieta, la actividad física, el estrés, las condiciones ambientales, el tipo y tiempo de conservación y de maduración de la carne o los hábitos culinarios (Sañudo *et al.*, 1998; Sañudo, 2006; Sañudo, 2008). Algunos de ellos no han sido bien estudiados o tienen una influencia variable o controvertida, mientras que otros son bastante conocidos y controlados.

La alimentación que reciben los animales es considerada como uno de los factores que más afecta a la producción y calidad de la canal y de la carne, tanto a corto como medio y largo plazo (Sami *et al.*, 2004). De hecho, existen evidencias que indican que diferentes estrategias de alimentación en las fases más tempranas de la vida causan modificaciones en el metabolismo que perduran en el tiempo, influyendo en la eficiencia de utilización de los nutrientes y en las características de los productos de origen animal (Morgan, 1972; Lippens *et al.*, 2000; Schoonmaker *et al.*, 2004).

6.1. Calidad de la canal

Aunque existe una falta de consistencia entre los diversos estudios realizados hasta la fecha, la tendencia general señala una correlación genética negativa entre el RFI y la conformación de la canal en el ganado vacuno, de tal forma que animales con bajo RFI (más eficientes) presentan, en general, mejor musculatura y conformación de la canal (Bouquet *et al.*, 2010; Crowley *et al.*, 2011). En cerdos, también se ha demostrado que la selección para un bajo RFI mejora la composición de la canal (con una mayor ratio músculo/grasa) y el rendimiento de la misma, a través de cambios en las propiedades del músculo (Gilbert *et al.*, 2007; Lefaucheur *et al.*, 2011).

Respecto al efecto de la nutrición en etapas tempranas de la vida, la mayoría de los estudios se han centrado en el periodo prenatal. En este contexto, Nordby *et al.* (1987) y Daniel *et al.* (2007) observaron que la restricción durante la gestación no afectó negativamente a la composición de la canal de los corderos en el momento del sacrificio. Sin embargo, apenas existen trabajos acerca de la restricción de alimento durante la lactancia de corderos sobre las características de la canal en etapas posteriores. En el estudio realizado por Rodríguez *et al.* (2008), las pérdidas por oreo fueron mayores en los corderos restringidos, lo que se atribuyó a la menor deposición de grasa observada en la canal de estos animales, en comparación con los corderos alimentados *ad libitum* durante la lactancia. Es bien sabido que el contenido de grasa tiene un efecto sobre las pérdidas por oreo, ya que la grasa disminuye la evaporación de agua (Johnson *et al.*, 1988). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este trabajo el sacrificio de los animales tuvo lugar durante el periodo de restricción, sin estudiar los efectos a largo plazo. Así, Manso *et al.* (1998) observaron una mayor proporción de proteína en la canal de corderos sometidos a un bajo nivel de ingestión durante el periodo de lactancia, seguido de un periodo posdestete de realimentación *ad libitum*,

dando como resultado canales más magras. Estos cambios podrían ser atribuidos al efecto del crecimiento compensatorio.

6.2. Calidad sensorial de la carne

El empeño en aumentar la eficiencia de alimentación y producción (incrementando la deposición de tejido magro y disminuyendo la deposición de grasa de la carne), con el objetivo de mejorar la rentabilidad de la producción animal, ha ido en detrimento de la calidad de la carne. Se ha demostrado que los cerdos seleccionados para un bajo RFI dan lugar a canales más magras y con un menor contenido de grasa intramuscular (Lefaucheur *et al.*, 2011). Si bien se podría pensar que los consumidores serían beneficiados por una carne más magra y menos cara, se ha demostrado que la reducción de los niveles de grasa intramuscular (IM) está asociada con un deterioro de algunos rasgos de la calidad de la carne, como la capacidad de retención de agua, el sabor, la jugosidad y la ternura (Devol *et al.*, 1988; Larzul *et al.*, 1997; Fernandez *et al.*, 1999; Rehfeldt *et al.*, 2000; Dunshea *et al.*, 2005).

De hecho, Hoque *et al.* (2009) observaron que el RFI está correlacionado negativamente con las pérdidas por cocinado y positivamente con los caracteres de acumulación de grasa en cerdos, de tal manera que la selección para reducir el RFI incrementa las pérdidas por cocinado de la carne y disminuye la acumulación de grasa en diferentes zonas, produciendo además una carne más oscura y seca. Lefaucheur *et al.* (2011) también encontraron mayores pérdidas de agua en el músculo de cerdos seleccionados para un bajo RFI.

En cambio, en un estudio realizado en novillos (McDonagh *et al.*, 2001), no se observaron diferencias en la calidad de la canal, ni en el contenido de grasa IM, grado de marmoleado, textura, el color de la carne o de la grasa entre los animales más o menos eficientes. Sin embargo, se observaron niveles más altos de calpastatina en el músculo de los novillos más eficientes, lo que podría haber reducido la fragmentación de miofibras a través de la inhibición de calpaínas. Esto podría proporcionar un mecanismo por el cual la selección para un bajo RFI podría ir acompañada de carne menos tierna. De esta forma, los niveles más altos de calpastatina, acompañados de menores tasas de degradación proteica en el músculo del animal vivo, pueden contribuir a mejorar la eficiencia de utilización de la energía en el músculo de los novillos con bajo RFI. Baker *et al.* (2006) tampoco encontraron diferencias en la calidad y

palatabilidad de la carne entre los novillos más y menos eficientes, en términos de flavor, terneza, textura y pérdidas por cocinado.

La selección para mejorar la eficiencia alimentaria (RFI) también se acompaña de una reducción en el espesor de la grasa subcutánea en novillos (Richardson *et al.*, 1998). A este respecto, aunque McDonagh *et al.* (2001) no encontraron diferencias en el contenido de grasa intramuscular, sí observaron una menor cantidad de grasa subcutánea sobre la costilla en los animales más eficientes.

La selección de animales más eficientes también podría perjudicar otros parámetros como el color de la carne. Así, varios autores han puesto de manifiesto que la selección para el RFI en cerdos aumenta la luminosidad (valor de coordenada L*) y las pérdidas por goteo de la carne, disminuyendo la calidad de la misma (Gilbert *et al.*, 2007; Lefaucheur *et al.*, 2011). De hecho, algunos autores han sugerido que la luminosidad puede estar relacionada con el contenido de grasa de la carne (Pérez-Álvarez *et al.*, 1998), siendo un valor inversamente proporcional al contenido de la misma.

En las últimas décadas se ha demostrado que las características de los tejidos en la vida posnatal (especialmente las del tejido muscular) tienen su origen en las primeras etapas de la vida (Picard *et al.*, 2002). De esta forma, el proceso de programación fetal determina no solo la masa muscular, sino también sus propiedades fisiológicas, como el número total y el tipo de fibras y, probablemente, la cantidad de grasa intramuscular (Zhu *et al.*, 2006; Daniel *et al.*, 2007; Hocquette *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2013; Sinclair *et al.*, 2016), influyendo, por ende, en parámetros como la textura, el color o el flavor. Además, también se ha demostrado la importancia de otros factores en relación con el contenido de grasa intramuscular en el momento del sacrificio, como la expresión temprana de genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos (p. ej., *ACACA*, *ACSS2*, *FASN*) (Cagnazzo *et al.*, 2006; Ponsuksili *et al.*, 2007).

En otros estudios (da Silva *et al.*, 2016), sin embargo, no observaron diferencias en los atributos físico-químicos y sensoriales de la carne de corderos sometidos a una restricción alimentaria durante el periodo prenatal o después del nacimiento (y hasta el momento del sacrificio a los 25 kg de peso vivo), proporcionando un producto de buena aceptación.

La calidad de la carne también puede ser modificada por la oxidación de esta, proceso producido tras la muerte del animal por los cambios bioquímicos que se producen para la conversión del músculo en carne. Esto provoca una rápida ruptura del equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes a favor de los primeros (Morrissey *et al.*, 1998; Morrissey y Kerry, 2010). La oxidación lipídica es una de las principales causas del deterioro de la carne, tanto de corderos de cebo como lechales, con un efecto directo sobre características como el flavor, color, textura, el valor nutritivo y la seguridad alimentaria. Otros factores que influyen en la oxidación lipídica de la carne son, por ejemplo, el periodo y tipo de almacenamiento o el tipo de cocinado (Liu *et al.*, 1995; Min y Ahn, 2005; Morán, 2013). Por otro lado, se sabe que el perfil de ácidos grasos afecta la estabilidad oxidativa durante el procesamiento y almacenamiento de la carne, ya que un alto contenido de PUFA, que son altamente susceptibles a los procesos de oxidación, implica una mayor oxidación lipídica, lo que también se traduce en una reducción de la vida útil de la carne (Min y Ahn, 2005).

Se ha demostrado que la edad y el peso al sacrificio son factores que también pueden influir en dicha oxidación lipídica, ya que afectan a la proporción, distribución y perfil lipídico de la grasa. A medida que aumenta el peso del animal, también se incrementa la proporción de grasa infiltrada en el músculo (Nürnberg *et al.*, 1998; Keane y Allen, 1999; Pérez *et al.*, 2002). Así, Martínez-Cerezos *et al.* (2002) observaron que el porcentaje de grasa se incrementaba de manera significativa con el peso al sacrificio. Sin embargo, pocos estudios se han realizado con respecto a la relación entre la eficiencia alimentaria y la estabilidad oxidativa de la carne.

6.3. Calidad nutricional de la carne

Hoy en día, el consumidor está cada vez más preocupado por la repercusión que tienen los alimentos de su dieta sobre su salud. Así, un factor muy importante para la salud de los consumidores es la relación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)/ácidos grasos saturados (SFA), considerándose que una relación PUFA/SFA menor de 0,45 es indicativa de carnes poco saludables. Esto se debe a que los ácidos grasos saturados, junto con los trans monoinsaturados, se han relacionado principalmente con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Department of health and social security, 1984; Geay *et al.*, 2001; Givens, 2005). La carne de rumiantes es especialmente criticada por su valor nutricional, puesto que el perfil de ácidos grasos se caracteriza por una baja relación PUFA/SFA (0,11 en vacuno y 0,15 en

corderos) (Wood y Enser, 1997; Enser *et al.*, 1998; Geay *et al.*, 2001). En este aspecto, también es determinante la cantidad de grasa intramuscular, ya que se ha demostrado que al aumentar el grado de engrasamiento, disminuye la relación PUFA/SFA (Martínez Marín, 2007). El contenido medio de grasa intramuscular en la carne de bovinos y ovinos jóvenes es de aproximadamente un 5% de la materia fresca, aunque depende de múltiples factores, como la raza, sexo, peso al sacrificio o alimentación (Bas y Sauvart, 2001; Okeudo y Moss, 2007; Rodríguez *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2011; Blanco *et al.* 2017; Andrés *et al.*, 2019).

Otro aspecto importante relacionado con la calidad nutricional es el contenido de determinados ácidos grasos, como el ácido linoleico y el ácido linoleico conjugado (CLA), beneficiosos debido a sus demostradas propiedades anticarcinogénicas, antiateroscleróticas, antitrombóticas, antihipercolesterolemias e inmunoestimuladoras; y que, además, están implicados en el aumento de la masa muscular, la reducción de la grasa corporal y la prevención de la diabetes y la obesidad (Pariza *et al.*, 2001; Roche *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2005; Silveira Rodríguez *et al.*, 2007). De hecho, el isómero CLA *cis*-9, *trans*-11, que está presente de forma natural principalmente en leche y carne de rumiantes, parece ejercer acciones antiinflamatorias a nivel del tejido adiposo y promover un aumento de la sensibilidad a la insulina (Poirier *et al.*, 2006; Moloney *et al.*, 2007; Silveira Rodríguez *et al.*, 2007). Asimismo, también es importante la ratio ácidos grasos omega 3 y omega 6 (n-3/n-6) de la carne. Se ha demostrado que los primeros tienen una serie de propiedades con efecto cardioprotector, mientras que algunos de los ácidos grasos omega 6 presentan propiedades proinflamatorias y asociadas con el desarrollo de diversas enfermedades (López Farré y Macaya, 2006; Simopoulos, 2008).

La mayoría de las investigaciones se han centrado en el estudio de diferentes tipos de dietas para mejorar la composición química y el perfil de ácidos grasos de la carne (Geay *et al.*, 2001; Morán *et al.*, 2013; Morán *et al.*, 2014; Blanco *et al.*, 2017); sin embargo, el efecto de la restricción temprana de alimento y la selección de animales más eficientes sobre las características nutricionales de la carne ha sido menos estudiado. En un trabajo realizado por da Silva *et al.* (2016), la restricción alimentaria de corderos de cebo, tanto prenatal como posnatal (desde los 10 hasta los 25 kg de peso vivo, cuando se sacrificaron), no influyó en la composición química de la carne, de forma que no observaron diferencias ni en la cantidad de ácidos grasos saturados ni en

la relación PUFA/SFA. En cambio, en cerdos, la restricción de alimento (entre los 25 y los 90 kg de peso vivo) se ha relacionado con carnes más magras y con un mayor contenido de ácidos grasos insaturados en el momento del sacrificio (a los 95 kg de peso vivo) (Wood *et al.*, 1996). No obstante, la disparidad de los resultados podría ser debida a diferencias en la especie o en las condiciones experimentales empleadas (nivel de alimentación, momento y duración de la restricción, existencia de un periodo de realimentación, etc.). Respecto a la relación con el RFI, Horodyska *et al.* (2018) observaron un menor contenido de grasa intramuscular en la carne de los cerdos más eficientes (bajo RFI) y, por tanto, un menor contenido de SFA y ácidos grasos monoinsaturados (MUFA); además de una mayor proporción de PUFA en la grasa IM, lo que indica un perfil más saludable de la carne de estos animales.

Con todo ello, podemos decir que la actual falta de comprensión de la base biológica de la variación en el RFI (y la eficiencia alimentaria), así como de su asociación genética con estos parámetros, hace que la búsqueda de animales más eficientes deba acompañarse de la supervisión de cualquier respuesta correlacionada en la calidad de la canal y de la carne. Es bien sabido que el periodo perinatal es una etapa crítica en el desarrollo donde los cambios en la nutrición pueden alterar el desarrollo del músculo esquelético, al menos a corto plazo (Dauncey y Harrison, 1996; Karunaratne *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2010). Así, el régimen de alimentación durante las primeras etapas de la vida podría ser usado como estrategia para controlar o modificar las características de la calidad de la canal y de la carne. De hecho, existen evidencias de la programación metabólica causada por la restricción prenatal que afecta la estructura y la función celular de los músculos después del nacimiento. Por ello, es importante estudiar también la relación entre el nivel de alimentación durante la lactancia de corderos y la calidad de la canal y de la carne de los animales en las diferentes etapas de producción (corderos lechales y de cebo), a través de los eventos de programación metabólica.

7. Relación entre eficiencia alimentaria y parámetros reproductivos

Por razones económicas, en los animales de abasto se busca reducir al máximo el periodo improductivo de los individuos destinados a fines reproductivos o a la producción láctea. En el caso de las hembras, el más importante y costoso tiene lugar desde el nacimiento hasta el primer parto (Lawrence y Fowler, 2002). Por ello, una buena forma de aumentar la rentabilidad de las explotaciones es reducir los periodos improductivos y prolongar la vida útil de las hembras.

Los principales reguladores de la reproducción son las reservas corporales y la ingesta de nutrientes. Así, la necesidad de mejorar la productividad del ganado ovino ha llevado a investigar cómo la nutrición afecta a la aparición de la pubertad y a otros factores relacionados con la reproducción (fecundidad, fertilidad, etc.) (Boulanouar *et al.*, 1995; Landau y Molle, 1997; Robinson *et al.*, 2006).

La edad en el momento de la pubertad es un rasgo importante con respecto al rendimiento reproductivo general, puesto que la eficiencia reproductiva de todo el rebaño de ovejas podría mejorarse si las ovejas alcanzan la pubertad pronto y producen su primer cordero en el menor tiempo posible (Ferguson *et al.*, 2011; Rosales Nieto *et al.*, 2013). Se define la pubertad como el periodo en que un animal se vuelve capaz por primera vez de reproducirse sexualmente. Este período viene marcado por la maduración del sistema endocrino reproductivo y de los órganos sexuales, y por la aparición de características sexuales secundarias (Basarab *et al.*, 2012). En las hembras, se considera el momento en que el animal tiene su primer celo, aunque en ovejas se considera la primera ovulación, ya que esta antecede dos o tres semanas al primer celo (Foster y Jackson, 2006). En el caso del ovino existe, además, una regulación externa sobre el comienzo y el mantenimiento de la actividad cíclica del ovario. Así, el fotoperiodo es uno de los factores más importantes que pueden afectar al inicio de la pubertad y la actividad ovárica, pero también intervienen otros como el peso corporal, la raza, época de nacimiento, nutrición recibida, la temperatura, la presencia de otros animales (sobre todo machos), etc. (Lawrence y Fowler, 2002; Valasi *et al.*, 2012). En términos de edad, la literatura existente sugiere que la mayoría de las ovejas alcanzan la pubertad entre los 6-18 meses (Lawrence y Fowler, 2002). Obviamente, este es un rango muy amplio debido a los factores comentados anteriormente.

Respecto al efecto de la nutrición, se ha establecido que una ingesta inadecuada de nutrientes, así como un balance energético negativo, dan como resultado una secreción pulsátil inadecuada de la hormona luteinizante (LH) y un crecimiento folicular ovárico reducido (Rasby *et al.*, 1992; Basarab *et al.*, 2012). De esta manera, la nutrición puede afectar todo el eje endocrino reproductivo, incluidos el hipotálamo, la hipófisis anterior y los ovarios (Schillo, 1992). Cuando la restricción alimentaria acontece en las primeras etapas de vida puede retrasar el inicio de la pubertad, alargando la fase improductiva de las corderas de cría antes de que alcancen la madurez sexual (Boulanouar *et al.*, 1995; Chilliard *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 2002;

Robinson *et al.*, 2006). En el estudio realizado por Boulanouar *et al.* (1995), las corderas sometidas a una restricción energética durante todo el periodo experimental alcanzaron la pubertad 17 días más tarde que las del grupo control. Además, el grupo de corderas que, tras un periodo de restricción energética de 9 semanas, se sometió a la dieta control, también alcanzó la pubertad 12 días más tarde que el grupo control. De esta forma, si se restringe el crecimiento durante los primeros años de vida, las ovejas jóvenes permanecerán prepúberes hasta que se alcance la proporción requerida de masa corporal madura (Foster *et al.*, 1985). En ratas se ha observado un retraso en el inicio de la pubertad en los animales sometidos a un retraso del crecimiento intrauterino o a una subnutrición durante el periodo posnatal (Engelbregt *et al.*, 2002; da Silva Faria *et al.*, 2004), mientras que la sobrealimentación prenatal acelera el inicio de la pubertad (Sloboda *et al.*, 2009).

Una nutrición insuficiente durante las primeras semanas de vida de corderas de cría puede influir, además, en el rendimiento reproductivo a largo plazo como consecuencia de la programación nutricional causada por la restricción de alimento (Robinson, 1996). En este sentido, en el estudio realizado por Castellano *et al.* (2011), la subnutrición posnatal en ratas provocó un retraso en el inicio de la pubertad, pero también una disminución persistente en el peso corporal, y menor peso del ovario y del útero. La base de este fenómeno de programación metabólica se ha atribuido a la alteración de la expresión hipotalámica del gen *Kiss1* (kisspeptina), implicado en la regulación de la secreción de GnRH y, por tanto, en la maduración y función del sistema reproductivo.

Diversos estudios realizados en la especie ovina han demostrado que una alimentación inadecuada durante la gestación reduce la tasa de ovulación (Rae *et al.*, 2002), la capacidad reproductiva a lo largo de la vida adulta (Gunn *et al.*, 1995; Rhind *et al.*, 1998), la concentración de progesterona periférica (P4) (Long *et al.*, 2013) y la fertilidad (Long *et al.*, 2010) en las corderas de la descendencia. Asimismo, Gunn (1983) y Williams (1984) observaron que la restricción de alimento durante las primeras semanas de vida de corderas redujo significativamente sus tasas de ovulación en la edad adulta. Por su parte, Rhind *et al.* (1998) encontraron que las corderas sometidas a una restricción alimentaria antes del destete tuvieron una incidencia significativamente más baja de nacimientos múltiples durante toda la vida, lo que causó, por tanto, una reducción permanente significativa en su posterior prolificidad en la etapa adulta.

Existen pocos estudios acerca de la relación entre la eficiencia alimentaria (RFI) y el rendimiento reproductivo de los animales de granja, con resultados dispares entre los diferentes autores. Si nos basamos en la independencia del RFI de la mayoría de los demás parámetros productivos, el RFI debería ser independiente también de la fertilidad. De hecho, en el trabajo realizado por Shaffer *et al.* (2011) en novillas, ni la tasa de concepción al primer servicio ni la tasa de preñez se vieron afectadas por el RFI. Blair *et al.* (2013) tampoco pudieron demostrar una relación aparentemente desfavorable entre el RFI y la fertilidad, determinada en función de diferentes parámetros como la tasa de preñez, tasa de concepción al primer servicio, tasa de partos o la fecha de parto.

En cambio, Basarab *et al.* (2011) sí observaron peores tasas de concepción, gestación y partos en las novillas más eficientes (RFI-). Arthur *et al.* (2005) fueron los primeros en demostrar los efectos negativos de un bajo RFI sobre la fertilidad en el ganado vacuno. Estos autores observaron que las novillas con un bajo RFI parieron 5 días más tarde que aquellas con un alto RFI, un efecto que se atribuyó a un retraso en la pubertad o en la concepción. En un estudio posterior, Basarab *et al.* (2007) encontraron que las vacas que producen una progenie con bajo RFI parieron 5-6 días más tarde en la siguiente temporada de partos que las madres que produjeron una progenie con un RFI medio y alto, y sugirieron que el efecto se debió a un retraso en el primer estro que resultó en un retraso en la concepción durante la temporada de cría. Los resultados observados por Donoghue *et al.* (2011) también indicaron un retraso en la gestación durante la primera temporada de apareamiento para las novillas con bajo RFI, retrasando a su vez la fecha de parto.

En esta misma línea, en el estudio llevado a cabo por Shaffer *et al.* (2011), las novillas con mayor RFI alcanzaron la pubertad antes que aquellas con bajo RFI. Además, se estableció una relación lineal negativa entre el RFI y la edad a la pubertad, indicando que un aumento de 1 unidad en el RFI daría como resultado una reducción de la edad a la pubertad en un promedio de 7,54 días. Esto es importante, ya que puede influir en la edad al primer parto y en la subsecuente vida productiva de la hembra. Por el contrario, Basarab *et al.* (2011) no encontraron diferencias entre novillas con diferente RFI en la edad y peso a la pubertad, pero sí cuando el RFI se ajustó para el grosor de la grasa dorsal y la frecuencia de alimentación, alcanzando la pubertad más tarde y con mayor peso los animales con RFI negativo.

Estas diferencias en el inicio de la pubertad entre animales con RFI divergente podrían estar asociadas con diferencias en la cantidad de grasa corporal o en la tasa de metabolismo, que pueden afectar negativamente la madurez reproductiva (Johnston *et al.*, 2009; Basarab *et al.* 2011; Shaffer *et al.*, 2011). Estos autores sugieren que el mayor consumo de alimento y el consecuente mayor acúmulo de grasa en los animales menos eficientes (alto RFI) habrían acelerado el inicio de la pubertad.

En el caso de los cerdos, Young *et al.* (2010) y Young *et al.* (2016) observaron que la selección para un bajo RFI durante el periodo de crecimiento no tiene efectos perjudiciales sobre el rendimiento reproductivo de la cerda, resultando, de hecho, en un mayor tamaño de la camada y un mayor crecimiento antes del destete. En cambio, la selección en ratones para una baja pérdida/producción de calor, un parámetro similar a la selección para el RFI, afecta negativamente el tamaño de la camada a través de cambios en la tasa de ovulación (Nielsen *et al.*, 1997).

Los trabajos realizados, por tanto, no son concluyentes y, por todo ello, se requieren más estudios para clarificar el efecto de la restricción de alimento durante la lactancia sobre los caracteres reproductivos indicadores de fertilidad durante las etapas posteriores de la vida en corderas de recría, así como conocer los mecanismos moleculares implicados en la programación metabólica que se produce a través del eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-ovario.

Referencias

- ADAM, I., YOUNG, B.A., NICOL, A.M. & DEGEN, A.A. 1984. Energy cost of eating in cattle given diets of different form. *Animal Production* 38, 53-56.
- AKBAR, H., BIONAZ, M., CARLSON, D.B., RODRIGUEZ-ZAS, S.L., EVERTS, R.E., LEWIN, H.A., DRACKLEY, J.K. & LOOR, J.J. 2013. Feed restriction, but not l-carnitine infusion, alters the liver transcriptome by inhibiting sterol synthesis and mitochondrial oxidative phosphorylation and increasing gluconeogenesis in mid-lactation dairy cows. *Journal Dairy Science* 96, 2201-2213.
- ALLEN, M.S. & MERTENS, D.R. 1988. Evaluation constrains on fiber digestion by rumen microbes. *Journal of Nutrition* 118, 261-70.

- ALONSO MIELGO, A.M. 2002. Desarrollo y situación actual de la agricultura ecológica: elementos de análisis para entender el caso español. *Estudios Agrosociales y Pesqueros* 192, 123-159.
- ANDRÉS, S., JARAMILLO, E., MATEO, J., CARO, I., CARBALLO, D.E., LÓPEZ, S. & GIRÁLDEZ, F.J. 2019. Grain grinding size of cereals in complete pelleted diets for growing lambs: Effects on animal performance, carcass and meat quality traits. *Meat Science* 157, 107874.
- ANIMAL TASK FORCE, 2013. Research & innovation for a sustainable livestock sector in Europe. Disponible Online: <http://www.animaltaskforce.eu/Portals/0/ATF/horizon2020/ATF%20white%20paper%20Research%20priorities%20for%20a%20sustainable%20livestock%20sector%20in%20Europe.pdf> [Consultado el 10/03/2020].
- ARAUJO-FEBRES, O. 2005. Factores que afectan el consumo voluntario en bovinos a pastoreo en condiciones tropicales. *IX Seminario de pastos y Forrajes*. Universidad de Zulia, Venezuela.
- ARCHER, J.A., RICHARDSON, E.C., HERD, R.M. & ARTHUR, P.F. 1999. Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle: A review. *Australian Journal of Agricultural Research* 50, 147-161.
- ARTHUR, P.F., ARCHER, J.A., JOHNSTON, D.J., HERD, R.M., RICHARDSON, E.C. & PARNELL, P.F. 2001a. Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency, and other postweaning traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science* 79, 2805-2811.
- ARTHUR, P.F. & HERD, R.M. 2012. Genetic improvement of feed efficiency. En: HILL, R.A (ed.). *Feed efficiency in the beef industry*. 1ª ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 93-103.
- ARTHUR, P.F., HERD, R.M., WILKINS, J.F. & ARCHER, J.A. 2005. Maternal productivity of Angus cows divergently selected for post-weaning residual feed intake. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 45, 985-993.
- ARTHUR, P.F., RENAND, G. & KRAUSS, D. 2001b. Genetic and phenotypic relationships among different measures of growth and efficiency in young Charolais bulls. *Livestock Production Science* 68, 131-139.

- ATTEBERY, J.T. & JOHNSON, H.D. 1969. Effect of environmental temperature, controlled feeding and fasting on rumen motility. *Journal of Animal Science* 29, 727.
- BACH, A. 2012. Ruminant Nutrition Symposium: Optimizing performance of the offspring: Nourishing and managing the dam and postnatal calf for optimal lactation, reproduction, and immunity. *Journal of Animal Science* 90, 1835-1845.
- BAILE, C.A. & FORBES, J.M. 1974. Control of feed intake and regulation of energy balance in ruminants. *Physiological Reviews* 54, 160-214.
- BAKER, S.D., SZASZ, J.I., KLEIN, T.A., KUBER, P.S., HUNT, C.W., GLAZE, J.B. JR., FALK, D., RICHARD, R., MILLER, J.C., BATTAGLIA, R.A. & HILL, R.A. 2006. Residual feed intake of purebred Angus steers: effects on meat quality and palatability. *Journal of Animal Science* 84, 938-945.
- BARKER, D.J.P. 1995a. Intrauterine programming of adult disease. *Molecular Medicine Today* 1, 418-423.
- BARKER, D.J.P. 1995b. Fetal origins of coronary heart disease. *British Medical Journal* 311, 171-174.
- BARKER, D.J.P. 2007. The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine* 261, 412-417.
- BARKER, D.J.P., GLUCKMAN, P.D., GODFREY, K.M., HARDING, J.E., OWENS, J.A. & ROBINSON, J. S. 1993a. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 2341, 938-941.
- BARKER, D.J.P., HALES, C.N., FALL, C.H.D., OSMOND, C., PHIPPS, K. & CLARK, P.M.S. 1993b. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36, 62-67.
- BARTOL, F.F., WILEY, A.A. MILLER, D.J., SILVA, A.J., ROBERTS, K.E., DAVOLT, M.L.P., CHEN, J.C., FRANKSHUN, A.-L., CAMP, M.E., RAHMAN, K.M., VALLET, J.L. & BAGNELL, C.A. 2013. Lactation biology

- symposium: Lactocrine signaling and developmental programming. *Journal of Animal Science* 91, 696-705.
- BAS, P. & SAUVANT, D. 2001. Variations de la composition des dépôts lipidiques chez les bovins. *INRA Productions Animales* 14, 311-322.
- BASARAB, J.A., BEAUCHEMIN, K.A., BARON, V.S., OMINSKI, K.H., GUAN, L.L., MILLER, S.P. & CROWLEY, J.J. 2013. Reducing GHG emissions through genetic improvement for feed efficiency: effects on economically important traits and enteric methane production. *Animal* 7, 303-315.
- BASARAB, J.A., COLAZO, M.G., AMBROSE, D.J., NOVAK, S., MCCARTNEY, D. & BARON, V.S. 2011. Residual feed intake adjusted for backfat thickness and feeding frequency is independent of fertility in beef heifers. *Canadian Journal of Animal Science* 91, 573-584.
- BASARAB, A., FITZSIMMONS, C., WHISNANT, C.S. & WETTEMANN, R.P. 2012. Interactions with other traits: Reproduction and fertility. *En: HILL, R.A (ed.). Feed efficiency in the beef industry*. 1^a ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 123-144.
- BASARAB, J.A., MCCARTNEY, D., OKINE, E.K. & BARON, V.S. 2007. Relationship between progeny residual feed intake and dam productivity traits. *Canadian Journal of Animal Science* 87, 489-502.
- BASARAB, J.A., PRICE, M.A., AALHUS, J.L., OKINE, E.K., SNELLING, W.M. & LYLE, K.L. 2003. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 83, 189-204.
- BASOGLU, A., BASPINAR, N., TENORI, L., VIGNOLI, A. & YILDIZ, R. 2016. Plasma metabolomics in calves with acute bronchopneumonia. *Metabolomics* 12, 128.
- BAUMGARD, L.H. & RHOADS, R.P. 2012. Ruminant Nutrition Symposium: Ruminant production and metabolic responses to heat stress. *Journal of Animal Science* 90, 1855-1865.
- BEAUCLERCQ, S., NADAL-DESBARATS, L., HENNEQUET-ANTIER, C., GABRIEL, I., TESSERAUD, S., CALENGE, F., LE BIHAN-DUVAL, E. &

- MIGNON-GRASTEAU, S. 2018. Relationships between digestive efficiency and metabolomic profiles of serum and intestinal contents in chickens. *Scientific Reports* 8, 6678.
- BEHJATI, S. & TARPEY, P.S. 2013. What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition* 98, 236-238.
- BELL, A. & GREENWOOD, P. 2016a. Nutrition during gestation influences postnatal productivity of ruminant livestock. *Feedipedia, Broadening Horizons* 30. Disponible Online: <https://www.feedipedia.org/content/nutrition-during-gestation-influences-postnatal-productivity-ruminant-livestock> [Consultado el 25/02/2020].
- BELL, A.W. & GREENWOOD, P.L. 2016b. Prenatal origins of postnatal variation in growth, development and productivity of ruminants. *Animal Production Science* 56, 1217-1232.
- BERETTA, V., SIMEONE, Á. & BENTANCUR, O. 2013. Manejo de la sombra asociado a la restricción del pastoreo: efecto sobre el comportamiento y performance estival de vacunos. *Agrociencia Uruguay* 17, 131-140.
- BERNAL, A.J. & JIRTLE, R.L. 2010. Epigenomic disruption: the effects of early developmental exposures. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology* 88, 938-44.
- BERRY, D.P. & CROWLEY, J.J. 2012. Residual intake and body weight gain: a new measure of efficiency in growing cattle. *Journal of Animal Science* 90, 109-115.
- BERRY, D.P. & CROWLEY, J.J. 2013. Cell Biology Symposium: genetics of feed efficiency in dairy and beef cattle. *Journal of Animal Science* 91, 1594-1613.
- BIRD, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* 16, 6-21.
- BIRD, A. & MACLEOD, D. 2004. Reading the DNA methylation signal. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 69, 113-118.
- BLACK, J.L. 1983. Growth and development of lambs. *En: HARESIGN, W. (ed.). Sheep Production*. Londres: Butterworths, 21-58.

- BLAIR, E.E., MINICK BORMANN, J., MOSER, D.W. & MARSTON, T.T. 2013. Relationship between residual feed intake and female reproductive measurements in heifers sired by high–or low–residual feed intake Angus bulls. *The Professional Animal Scientist* 29, 46-50.
- BLANCO, C., GIRÁLDEZ, J.F., MORÁN, L., MATEO, J., VILLALOBOS-DELGADO, L.H., ANDRÉS, S. & BODAS, R. 2017. Effects of sunflower soap stocks on light lamb meat quality. *Journal of Animal Science* 95, 3455-3466.
- BLAXTER, K.L. 1962. The energy metabolism of ruminants. Londres: Hutchinson & Co., 329 p.
- BONASIO, R., TU, S. & REINBERG, D. 2010. Molecular signals of epigenetic states. *Science* 330, 612-616.
- BONILHA, S.F.M., BRANCO, R.H., MERCADANTE, M.E.Z., CYRILLO, J.N.D.S., MONTEIRO, F.M. & RIBEIRO, E.G. 2017. Digestion and metabolism of low and high residual feed intake Nellore bulls. *Tropical Animal Health and Production* 49, 529-535.
- BOTTJE, W., IQBAL, M., PUMFORD, N., OJANO-DIRAIN, C. & LASSITER, K. 2004. Role of mitochondrial in the phenotypic expression of feed efficiency. *Journal of Applied Poultry Research* 13, 94-105.
- BOTTJE, W.G., TANG, Z.X., IQBAL, M., CAWTHON, D., OKIMOTO, R., WING, T. & COOPER, M. 2002. Association of mitochondrial function with feed efficiency within a single genetic line of male broilers. *Poultry Science* 81, 546-555.
- BOUCHARD, L. 2013. Epigenetics and fetal metabolic programming: A call for integrated research on larger cohorts. *Diabetes* 62, 1026-1028.
- BOULANOUAR, B., AHMED, M., KLOPFENSTEIN, T., BRINK, D. & KINDER, J. 1995. Dietary protein or energy restriction influences age and weight at puberty in ewe lambs. *Animal Reproduction Science* 40, 229-238.
- BOUQUET, A., FOUILLOUX, M.-N., RENAND, G. & PHOCAS, F. 2010. Genetic parameters for growth, muscularity, feed efficiency and carcass traits of young beef bulls. *Livestock Science* 129, 38-48.

- BRAASTAD, B.O. & KATLE, J. 1989. Behavioural differences between laying hen populations selected for high and low efficiency of food utilisation. *British Poultry Science* 30, 533-544.
- BURRIN, D.G., FERRELL, C.L., BRITTON, R.A. & BAUER, M. 1990. Level of nutrition and visceral organ size and metabolic activity in sheep. *British Journal of Nutrition* 64, 439-448.
- BUTTERFIELD, R.M. 1988. New concepts of sheep growth. The Department of Veterinary Anatomy. University of Sydney, 168 p.
- CAGNAZZO, M., TE PAS, M.F., PRIEM, J., DE WIT, A.A., POOL, M.H., DAVOLI, R. & RUSSO, V. 2006. Comparison of prenatal muscle tissue expression profiles of two pig breeds differing in muscle characteristics. *Journal of Animal Science* 84, 1-10.
- CAMMACK, K.M., LEYMASTER, K.A., JENKINS, T.G. & NIELSEN, M.K. 2005. Estimates of genetic parameters for feed intake, feeding behavior, and daily gain in composite ram lambs. *Journal of Animal Science* 83, 777-85.
- CANTALAPIEDRA-HIJAR, G., ABO-ISMAIL, M., CARSTENS, G.E., GUAN, L.L., HEGARTY, R., KENNY, D.A., MCGEE, M., PLASTOW, G., RELLING, A. & ORTIGUES-MARTY, I. 2018. Review: Biological determinants of between-animal variation in feed efficiency of growing beef cattle. *Animal* 12, s321-s325.
- CARBERRY, C.A., KENNY, D.A., HAN, S., MCCABE, M.S. & WATERS, S.M. 2012. Effect of phenotypic residual feed intake and dietary forage content on the rumen microbial community of beef cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 4948-4958.
- CARLSON, J.R. 1972. Reguladores de crecimiento. En: HAFEZ, D. & DYER, I.A. (eds.). *Desarrollo y Nutrición Animal*. Zaragoza: Editorial Acribia, 172-193.
- CARSTENS, G., JOHNSON, D., ELLENBERGER, M. & TATUM, J. 1991. Physical and chemical components of the empty body during compensatory growth in beef steers. *Journal of Animal Science* 69, 3251-3264.
- CASTELLANO, J.M., BENTSEN, A.H., SÁNCHEZ-GARRIDO, M.A., RUIZ-PINO, F., ROMERO, M., GARCIA-GALIANO, D., AGUILAR, E., PINILLA, L.,

- DIÉGUEZ, C., MIKKELSEN, J.D. & TENA-SEMPERE, M. 2011. Early metabolic programming of puberty onset: impact of changes in postnatal feeding and rearing conditions on the timing of puberty and development of the hypothalamic kisspeptin system. *Endocrinology* 152, 3396-408.
- CATON, J.S., BAUER, M.L. & HIDARI, H. 2000. Metabolic components of energy expenditure in growing beef cattle – review. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 13, 702-710.
- CECILIANI, F., ECKERSALL, D., BURCHMORE, R. & LECCHI, C. 2014. Proteomics in veterinary medicine: applications and trends in disease pathogenesis and diagnostics. *Veterinary Pathology* 51, 351-362.
- CHAVATTE-PALMER, P., VELAZQUEZ, M.A., JAMMES, H. & DURANTHON, V. 2018. Review: Epigenetics, developmental programming and nutrition in herbivores. *Animal* 12, s363-s371.
- CHEN, Y., GONDRO, C., QUINN, K., HERD, R.M., PARNELL, P.F. & VANSELOW, B. 2011. Global gene expression profiling reveals genes expressed differentially in cattle with high and low residual feed intake. *Animal Genetics* 42, 475-490.
- CHILLIARD, Y., BOCQUIER, F. & DOREAU, M. 1998. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reproduction, Nutrition, Development* 38, 131-152.
- CIRIA, J., ASENJO, B., MIGUEL, J.A. & CALVO, J.L. 2009. Alimentación del cordero: lactancia y cebo. En: SAÑUDO, C. & CEPERO, R. (eds.). *Ovinotecnia: producción y economía en la especie ovina: homenaje al profesor Isidro Sierra Alfranca*. Zaragoza: Prensas Universitarias de Zaragoza, 201-210.
- COLOMER-ROCHER, F. 1973. Exigencias de calidad en la canal. *Anales INIA, Serie Producción Animal* 4, 117-126.
- CONESA, A., MADRIGAL, P., TARAZONA, S., GÓMEZ-CABRERO, D., CERVERA, A., MCPHERSON, A., SZCZEŚNIAK, M.W., GAFFNEY, D.J., ELO, L.L., ZHANG, X. & MORTAZAVI, A. 2016. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology* 17, 13.

- CORNER, R.A., KENYON, P.R., STAFFORD, K.J., WEST, D.M., LOPEZ-VILLALOBOS, N., MORRIS, S. T. & OLIVER, M.H. 2008. Effect of nutrition from mid to late pregnancy on the performance of twin- and triplet-bearing ewes and their lambs. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48, 666-671.
- CREWS, D.H. JR. 2005. Genetic of efficient feed utilization and national cattle evaluation: A review. *Genetics and Molecular Research* 4, 152-165.
- CRISTEA, I.M., GASKELL, S.J. & WHETTON, A.D. 2004. Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood* 103, 3624-3634.
- CROWLEY, J.J., EVANS, R.D., MC HUGH, N., PABIOU, T., KENNY, D.A., MCGEE, M., CREWS JR., D.H. & BERRY, D.P. 2011. Genetic associations between feed efficiency measured in a performance test station and performance of growing cattle in commercial beef herds. *Journal of Animal Science* 89, 3382-3393.
- CRUZ, J. 2013. El sector ovino y caprino busca soluciones a la caída del consumo de la subida de los costes de producción. *Eurocarne* 220, 31-40.
- CRUZEN, S.M., HARRIS, A.J., HOLLINGER, K., PUNT, R.M., GRUBBS, J.K., SELSBY, J.T., LONERGAN, S.M. & HUFF-LONERGAN, E. 2013. Evidence of decreased muscle protein turnover in gilts selected for low residual feed intake. *Journal of Animal Science* 91, 4007-4016.
- DA SILVA, A.C.F., ARAÚJO COSTA, H.H., RODRIGUES PERES, M.C., COSTA, A.C., RODRIGUES DE SOUSA, D., MALVEIRA BATISTA, A.S. & VIEIRA LANDIM, A. 2016. Meat quality of Morada Nova lambs subjected to different feeding regimes. *Semina: Ciências Agrárias* 37, 911-920.
- DA SILVA FARIA, T., DA FONTE RAMOS, C. & SAMPAIO, F.J. 2004. Puberty onset in the female offspring of rats submitted to protein or energy restricted diet during lactation. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 15, 123-127.
- DANIEL, Z.C., BRAMELD, J.M., CRAIGON, J., SCOLLAN, N.D. & BUTTERY, P.J. 2007. Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on lamb carcass characteristics and muscle fiber composition. *Journal of Animal Science* 85, 1565-1576.

- DAUNCEY, M.J. & HARRISON, A.P. 1996. Developmental regulation of cation pumps in skeletal and cardiac muscle. *Acta Physiological Scandinavica* 156, 313-323.
- DAVIS, M.K. 2001. Breastfeeding and chronic disease in childhood and adolescence. *Pediatric Clinics of North America* 48, 125-141.
- DE HAER, L.C.M., LUITING, P. & AARTS, H.L.M. 1993. Relations among individual (residual) feed intake, growth performance and feed intake pattern of growing pigs in group housing. *Livestock Production Science* 36, 233-253.
- DELFA, R. & TEIXEIRA, A. 1998. Calidad de la canal ovina. En: BUXADÉ, C. (ed.). *Ovino de carne: aspectos claves*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 373-400.
- DELLA-FERA, M.A. & BAILE, C.A. 1984. Control of feed intake in sheep. *Journal of Animal Science* 59, 1362-1368.
- DEPARTMENT OF HEALTH AND SOCIAL SECURITY, 1984. Diet and cardiovascular disease. Report on health and social subjects 28. Londres: HMSO. Disponible Online: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/743801/Diet_and_Cardiovascular_Disease_1984.pdf [Consultado el 16/01/2020].
- DEVOL, D.L., MCKEITH, F.K., BECHTEL, P.J., NOVAKOFSKI, P.J., SHANKS, R.D. & CARR, T.R. 1988. Variation in composition and palatability traits and relationships between muscle characteristics and palatability in a random sample of pork carcasses. *Journal of Animal Science* 66, 385-395.
- DICOSTANZO, A., MEISKE, J.C., PLEGGE, S.D., PETERS, T.M. & GOODRICH, R.D. 1990. Within-herd variation in energy utilization for maintenance and gain in beef cows. *Journal of Animal Science* 68, 2156-2165.
- DONOGHUE, K.A., ARTHUR, P.F., WILKINS, J.F. & HERD, R.M. 2011. Onset of puberty and early-life reproduction in Angus females divergently selected for post-weaning residual feed intake. *Animal Production Science* 51, 183-190.
- DU, M., TONG, J., ZHAO, J., UNDERWOOD, K.R., ZHU, M., FORD, S.P. & NATHANIELSZ, P.W. 2010. Fetal programming of skeletal muscle

- development in ruminant animals. *Journal of Animal Science* 88(E. Suppl.), E51-E60.
- DUNSHEA, F.R., D'SOUZA, D.N., PETHICK, D.W., HARPER, G.S. & WARNER, R.D. 2005. Effects of dietary factors and other metabolic modifiers on quality and nutritional value of meat. *Meat Science* 71, 8-38.
- ELLIS, P.J., MORRIS, T.J., SKINNER, B.M., SARGENT, C.A., VICKERS, M.H., GLUCKMAN, P.D., GILMOUR, S. & AFFARA, N.A. 2014. Thrifty metabolic programming in rats is induced by both maternal undernutrition and postnatal leptin treatment, but masked in the presence of both: implications for models of developmental programming. *BMC Genomics*. 15, 49.
- ENGELBREGT, M.J., VAN WEISSENBRUCH, M.M., POPP-SNIJDERS, C. & DELEMARRE-VAN DE WAAL, H.A. 2002. Delayed first cycle in intrauterine growth-retarded and postnatally undernourished female rats: follicular growth and ovulation after stimulation with pregnant mare serum gonadotropin at first cycle. *The Journal of Endocrinology* 173, 297-304.
- ENSER, M., HALLETT, K.G., HEWETT, B., FURSEY, G.A.J., WOOD, J.D. & HARRINGTON, G. 1998. Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relation to production system and implications for human nutrition. *Meat Science* 49, 329-341.
- EUROSTAT, 2020. Sheep population - annual data. Statistical Office of the European Union. Disponible Online: https://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=apro_mt_1ssheep&lang=en [Consultado el 20/05/2020].
- FAO, 2009. The State of Food and Agriculture (SOFA) – Livestock in the balance. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Disponible Online: <http://www.fao.org/3/i0680e/i0680e00.htm> [Consultado el 15/03/2020].
- FAO, 2014. Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor. División de Producción y Sanidad Animal. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Disponible Online: http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/quality_meat.html [Consultado el 10/04/2020].

- FARFÁN, M.J. & TORRES, J.P. 2018. Diagnóstico en medicina en la era de las “ómicas”. *Revista Chilena de Pediatría* 89, 163-165.
- FAROOQ, U., SAMAD, H.A., SHEHZAD, F. & QAYYUM, A. 2010. Physiological responses of cattle to heat stress. *World Applied Sciences Journal* 8, 38-43.
- FERGUSON, M.B., KENNEDY, A.J., YOUNG, J.M. & THOMPSON, A.N. 2011. The roads to efficiency in the ewe flock. *Recent Advances in Animal Nutrition – Australia* 18, 37-42.
- FERNANDEZ, X., MONIN, G., TALMANT, A., MOUROT, J. & LEBRET B. 1999. Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat – 1. Composition of the lipid fraction and sensory characteristics of m. longissimus lumborum. *Meat Science* 53, 59-65.
- FERRELL, T.C. & JENKINS, T.G. 1998. Body composition and energy utilization by steers of diverse genotypes fed a high-concentrate diet during the finishing period. 1. Angus, Belgian Blue, Hereford, and Piedmontese sires. *Journal of Animal Science* 76, 637-646.
- FITZSIMONS, C., KENNY, D.A., FAHEY, A.G. & MCGEE, M. 2014. Visceral organ weights, digestion and carcass characteristics of beef bulls differing in residual feed intake offered a high concentrate diet. *Animal* 8, 949-959.
- FITZSIMONS, C., MCGEE, M., KEOGH, K., WATERS, S.M. & KENNY, D.A. 2017. Molecular physiology of feed efficiency in beef cattle. *En: SCANES, C.G. & HILL, R.A. (eds.). Biology of domestic animals*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 120-163.
- FORBES, J.M. 1986. The voluntary food intake of farm animals. Londres: Butterworths, 205 p.
- FORBES, J.M. 2007. Feeding behaviour. *En: FORBES, J.M. (ed.). Voluntary feed intake and diet selection in farm animal*. 2ª ed. Wallingford: CABI Publishing, 12-40.
- FOSTER, D.L. & JACKSON, L. 2006. Puberty in the sheep. *En: KNOBIL, E. & NEILL, J.D. (eds.). The Physiology of Reproduction*. 3ª ed. Nueva York: Academic Press, 2127-2176.

- FOSTER, D.L., YELLON, S.M. & OLSTER, D.H. 1985. Internal and external determinants of the timing of puberty in the female. *Journal of Reproduction and Fertility* 75, 327-344.
- FOX, D.G., SNIFFEN, C.J. & O'CONNOR, J.D. 1988. Adjusting nutrient requirements of beef cattle for animal and environmental variations. *Journal of Animal Science* 66, 1475-1495.
- FRASER, D. 2006. El bienestar animal y la intensificación de la producción animal. Una interpretación alternativa. Roma: Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO). Disponible Online: <http://www.fao.org/sustainable-food-value-chains/library/detalles/es/c/278610/> [Consultado el 20/02/2020].
- FRASER, D., MENCH, J. & MILLMAN, S. 2001. Farm animals and their welfare in 2000. *En*: SALEM, D.J. & ROWAN, A.N. (eds.). *The state of the animals 2001*. Washington, DC: Humane Society Press, 87-99.
- FREETLY, H.C., LINDHOLM-PERRY, A.K., HALES, K.E., BROWN-BRANDL, T.M., KIM, M., MYER, P.R. & WELLS, J.E. 2015. Methane production and methanogen levels in steers that differ in residual gain. *Journal of Animal Science* 93, 2375-2381.
- FRIEDRICH, T. 2014. Producción de alimentos de origen animal. Actualidad y perspectivas. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 48, 5-6.
- FUNSTON, R.N., LARSON, D.M. & VONNAHME, K.A. 2010. Effects of maternal nutrition on conceptus growth and offspring performance: implications for beef cattle production. *Journal of Animal Science* 88(13 Suppl.), E205-E215.
- GANAPATHY, V., BRANDSCH, M. & LEIBACH, F.H. 1994. Intestinal transport of amino acids and peptides. *En*: JOHNSON, L.R., ALPERS, D.H., CHRISTENSEN, J., JACOBSON, E.D. & WALSCH, J.H. (eds.). *Physiology of the gastrointestinal tract, Vol. 2*. Nueva York: Raven Press, 1773-1794.
- 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 nutrition. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289, R947-R954.

- GARRETT, W.N. 1980. Factors influencing energetic efficiency of beef production. *Journal of Animal Science* 51, 1034-1440.
- GEAY, Y., BAUCHART, D., HOCQUETTE, J.F. & CULIOLI, J. 2001. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reproduction, nutrition, development* 41, 1-26.
- GILBERT, H., BIDANEL, J.P., GRUAND, J., CARITEZ, J.C., BILLON, Y., GUILLOUET, P., LAGANT, H., NOBLET, J. & SELIER, P. 2007. Genetic parameters for residual feed intake in growing pigs, with emphasis on genetic relationships with carcass and meat quality traits. *Journal of Animal Science* 85, 3182-3188.
- GILBERT, H., BILLON, Y., BROSSARD, L., FAURE, J., GATELLIER, P., GONDRET, F., LABUSSIÈRE, E., LEBRET, B., LEFAUCHEUR, L., LE FLOCH, N., LOUVEAU, I., MERLOT, E., MEUNIER-SALAÜN, M.C., MONTAGNE, L., MORMEDE, P., RENAUDEAU, D., RIQUET, J., ROGEL-GAILLARD, C., VAN MILGEN, J., VINCENT, A. & NOBLET, J. 2017. Review: divergent selection for residual feed intake in the growing pig. *Animal* 11, 1427-1439.
- GIRONELLA, M. 2010. Nuevos métodos de diagnóstico molecular. Transcriptómica (mARN y miR). *Gastroenterología y Hepatología Continuada* 9, 160-164.
- GIVENS, D. 2005. The role of animal nutrition in improving the nutritive value of animal-derived foods in relation to chronic disease. *Proceedings of the Nutrition Society* 64, 395-402.
- GLUCKMAN, P. & HANSON, M. 2006. The developmental origins of health and disease: an overview. *En: GLUCKMAN, P. & HANSON, M. (eds.). Developmental Origins of Health and Disease*. Cambridge: Cambridge University Press, 1-5.
- GLUCKMAN, P.D., LILLYCROP, K.A., VICKERS, M.H., PLEASANTS, A.B., PHILLIPS, E.S., BEEDLE, A.S., BURDGE, G.C. & HANSON, M.A. 2007. Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent

- on early nutritional status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 12796-12800.
- GOLDEN, J.W., KERLEY, M.S. & KOLATH, W.H. 2008. The relationship of feeding behavior to residual feed intake in crossbred Angus steers fed traditional and no-roughage diets. *Journal of Animal Science* 86, 180-186.
- GONZÁLEZ-BARRANCO, J. & RÍOS-TORRES, J.M. 2004. Early malnutrition and metabolic abnormalities later in life. *Nutrition Reviews* 62, S134-S139.
- GRAHAM, N.MCC. 1982. Maintenance and growth. *En: COOP, I.E. (ed.). Sheep and goat production*. Amsterdam: Elsevier, 81-101.
- GRAVERT, H.O. 1985. Genetic factors controlling feed efficiency in dairy cows. *Livestock Production Science* 13, 87-99.
- GREEFF, J.C., MEISSNER, H.H., ROUX, C.Z. & JANSE VAN RENSBURG, R.J. 1986. The effect of compensatory growth on feed intake, growth rate and efficiency of feed utilization in sheep. *South African Journal of Animal Science* 16, 155-161.
- GRUBBS, J.K., FRITCHEN, A.N., HUFF-LONERGAN, E., GABLER, N.K. & LONERGAN, S.M. 2013. Selection for residual feed intake alters the mitochondria protein profile in pigs. *Journal of Proteomics* 80, 334-345.
- GUAN, L., NKRUMAH, J.D., BASARAB, J.A. & MOORE, S.S. 2008. Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. *FEMS Microbiology Letters* 288, 85-91.
- GUNN, R.G. 1983. The influence of nutrition on the reproductive performance of ewes. *En: HARESIGN, W. (ed.). Sheep Production*. Londres: Butterworths, 99-110.
- GUNN, R.G., SIMS, D.A. & HUNTER, E.A. 1995. Effects of nutrition in utero and in early life on the subsequent lifetime reproductive performance of Scottish Blackface ewes in two management systems. *Animal Science* 60, 223-230.
- HALES, C.N. & BARKER, D.J. 2001. The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin* 60, 5-20.

- HALES, C.N. & BARKER, D.J. 2013. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. 1992. *International Journal of Epidemiology* 42, 1215-1222.
- HAMMOND, J. 1966. Principios de la explotación animal (Reproducción, crecimiento y herencia). 2ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 363 p.
- HAN, X., ASLANIAN, A. & YATES, J.R. 3rd. 2008. Mass Spectrometry for Proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* 12, 483-490.
- HAOUDI, A. & BENSMAIL, H. 2006. Bioinformatics and data mining in proteomics. *Expert Reviews of Proteomics* 3, 333-343.
- HARDER, T., BERGMANN, R., KALLISCHNIGG, G. & PLAGEMANN, A. 2005. Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis. *American Journal of Epidemiology* 162, 397-403.
- HEINDEL, J.J., BALBUS, J., BIRNBAUM, L., BRUNE-DRISSE, M.N., GRANDJEAN, P., GRAY, K., LANDRIGAN, P.J., SLY, P.D., SUK, W., CORY SLECHTA, D., THOMPSON, C. & HANSON, M. 2015. Developmental Origins of Health and Disease: Integrating environmental influences. *Endocrinology* 156, 3416-3421.
- HERD, R.M. & ARTHUR, P.F. 2009. Physiological basis for residual feed intake. *Journal of Animal Science* 87(14 Suppl.), E64-E71.
- HERD, R.M., ODDY, V.H. & RICHARDSON, E.C. 2004. Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 1. Review of potential mechanisms. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44, 423-430.
- HERNANDEZ-SANABRIA, E., GOONEWARDENE, L.A., WANG, Z., DURUNNA, O.N. & MOORE, S.S. 2012. Impact of feed efficiency and diet on adaptive variations in the bacterial community in the rumen fluid of cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 1203-1214.
- HERNANDEZ-SANABRIA, E., GUAN, L.L., GOONEWARDENE, L.A., LI, M., MUJIBI, D.F., STOTHARD, P., MOORE, S.S. & LEON-QUINTERO, M.C. 2010. Correlation of particular bacterial PCR-denaturing gradient gel

- electrophoresis patterns with bovine ruminal fermentation parameters and feed efficiency traits. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 6338-6350.
- HIETER, P. & BOGUSKI, M. 1997. Functional genomics: it's all how you read it. *Science* 278, 601-602.
- HOCQUETTE, J.F., GONDRET, F., BAÉZA, E., MÉDALE, F., JURIE, C. & PETHICK, D.W. 2010. Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal* 4, 303-319.
- HOLLIDAY, R. 2002. Epigenetics comes of age in the twenty first century. *Journal of Genetics* 81, 1-4.
- HOQUE, M.A., KATOH, K. & SUZUKI, K. 2009. Genetic associations of residual feed intake with serum insulin-like growth factor-I and leptin concentrations, meat quality, and carcass cross sectional fat area ratios in Duroc pig. *Journal of Animal Science* 87, 3069-3075.
- HORODYSKA, J., OSTER, M., REYER, H., MULLEN, A.M., LAWLOR, P.G., WIMMERS, K. & HAMILL, R.M. 2018. Analysis of meat quality traits and gene expression profiling of pigs divergent in residual feed intake. *Meat Science* 137, 265-274.
- IQBAL, M., PUMFORD, N., TANG, Z.X., LASSITER, K., OJANO-DIRAIN, C., WING, T., COOPER, M. & BOTTJE, W. 2005. Compromised liver mitochondrial function and complex activity in low feed efficient broilers are associated with higher oxidative stress and differential protein expression. *Poultry Science* 84, 933-941.
- JÉGOU, M., GONDRET, F., VINCENT, A., TRÉFEU, C., GILBERT, H. & LOUVEAU, I. 2016. Whole blood transcriptomics is relevant to identify molecular changes in response to genetic selection for feed efficiency and nutritional status in the pig. *PLoS One* 11, e0146550.
- JIRTLE, R.L. & SKINNER, M.K. 2007. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics* 8, 253-262.

- JOHNSON, R.D., HUNT, M.C., ALLEN, D.M., KASTNER, C.L., DANLER, R.J. & SCHROCK, C.C. 1988. Moisture uptake during washing and spray chilling of holstein and beef-type steer carcasses. *Journal Animal Science* 66, 2180-2184.
- JOHNSON, D.E., JOHNSON, K.A. & BALDWIN, R.L. 1990. Changes in liver and gastrointestinal tract energy demands in response to physiological workload in ruminants. *The Journal of Nutrition* 120, 649-655.
- JOHNSTON, D.J., BARWICK, S.A., CORBET, N.J., FORDYCE, G., HOLROYD, R.G., WILLIAMS, P.J. & BURROW, H.M. 2009. Genetics of heifer puberty in two tropical beef genotypes in northern Australia and association with heifer- and steer-production traits. *Animal Production Science* 49, 399-412.
- KADARMIDEEN, H.N. 2014. Genomics to systems biology in animal and veterinary sciences: Progress, lessons and opportunities. *Livestock Science* 166, 232-248.
- KADARMIDEEN, H.N. & REVERTER, A. 2007. Combined genetic, genomic and transcriptomic methods in the analysis of animal traits. *CAB Reviews: Perspectives Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Nature Resources* 2, 16.
- KARPIEVITCH, Y.V., POLPITIYA, A.D., ANDERSON, G.A., SMITH, R.D. & DABNEY, A.R. 2010. Liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics: Biological and technological aspects. *The Annals of Applied Statistics* 4, 1797-1823.
- KARUNARATNE, J.F., ASHTON, C.J. & STICKLAND, N.C. 2005. Fetal programming of fat and collagen in porcine skeletal muscles. *Journal of Anatomy* 207, 763-768.
- KEANE, M.G. & ALLEN, P. 1999. Effects of pasture fertiliser N level on herbage composition, animal performance and on carcass and meat quality traits. *Livestock Production Science* 61, 233-244.
- KELLY, A.K., MCGEE, M., CREWS, D.H. JR., FAHEY, A.G., WYLIE, A.R. & KENNY, D.A. 2010. Effect of divergence in residual feed intake on feeding behavior, blood metabolic variables, and body composition traits in growing beef heifers. *Journal of Animal Science* 88, 109-123.

- KENÉZ, Á., KOCH, C., KORST, M., KESSER, J., EDER, K., SAUERWEIN, H. & HUBER, K. 2018. Different milk feeding intensities during the first 4 weeks of rearing dairy calves: Part 3: Plasma metabolomics analysis reveals long-term metabolic imprinting in Holstein heifers. *Journal Dairy Science* 101, 8446-8460.
- KENYON, P.R., BLAIR, H.T., JENKINSON, C.M.C., MORRIS, S.T., MACKENZIE, D.D.S., PETERSON, S.W., FIRTH, E.C. & JOHNSTON, P.L. 2009. The effect of ewe size and nutritional regimen beginning in early pregnancy on ewe and lamb performance to weaning. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 52, 203-212.
- KNAP, P.W. 2005. Breeding robust pigs. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 45, 763-773.
- KNOTT, S.A., CUMMINS, L.J., DUNSHEA, F.R. & LEURY, B.J. 2008. Rams with poor feed efficiency are highly responsive to an exogenous adrenocorticotropin hormone (ACTH) challenge. *Domestic Animal Endocrinology* 34, 261-268.
- KOCH, R.M., SWIGER, L.A., CHAMBERS, D. & GREGORY, K.E. 1963. Efficiency of feed use in beef cattle. *Journal of Animal Science* 22, 486-494.
- KOLATH, W.H., KERLEY, M.S., GOLDEN, J.W. & KEISLER, D.H. 2006. The relationship between mitochondrial function and residual feed intake in Angus steers. *Journal of Animal Science* 84, 861-865.
- KOLETZKO, B., BRANDS, B., POSTON, L., GODFREY, K. & DEMMELMAIR, H. 2012. Early Nutrition Project. Early nutrition programming of long-term health. *The Proceedings of the Nutrition Society* 71, 371-378.
- KORVER, S. 1988. Genetics aspects of feed intake and feed efficiency in dairy cattle. A review. *Livestock Production Science* 20, 1.
- KRUEGER, W.K., CARSTENS, G.E., GOMEZ, R.R., BOURG, B.M., LANCASTER, P.A., SLAY, L.J., MILLER, J.C., ANDERSON, R.C., HORROCKS, S.M., KRUEGER, N.A. & FORBES, T.D.A. 2009a. Relationships between residual feed intake and apparent nutrient digestibility, in vitro methane producing activity and VFA concentrations in growing Brangus heifers. *Journal of Animal Science* 87(E-suppl. 2), 129 (Abstract page no. 153).

- KRUEGER, W.K., CARSTENS, G.E., PADDOCK, Z.D., CALLOWAY, T.R., ANDERSON, R.C., KREUGER, N.A., GONTCHAROVA, V., DOWD, S.E., GOMEZ, R.R. & PINCHAK, W.E. 2009b. Associations between feed efficiency and gut microbial ecology and fermentation parameters in feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 87(E-suppl. 2), T312 (Abstract page no. 295).
- KUHLA, B., ALBRECHT, D., KUHLA, S. & METGES, C.C. 2009. Proteome analysis of fatty liver in feed-deprived dairy cows reveals interaction of fuel sensing, calcium, fatty acid, and glycogen metabolism. *Physiological Genomics* 37, 88-98.
- LANDAU, S. & MOLLE, G. 1997. Nutrition effects on fertility in small ruminants with an emphasis on Mediterranean sheep breeding systems. *En: LINDBERG, J.E., GONDA, H.L. & LEDIN, I. (eds.). Recent advances in small ruminant nutrition.* Zaragoza: CIHEAM, 203-216.
- LANGLEY-EVANS, S.C. 2006. Developmental programming of health and disease. *The Proceedings of the Nutrition Society* 65, 97-105.
- LARZUL, C., LEFAUCHEUR, L., ECOLAN, P., GOGUÉ, J., TALMANT, A., SELLIER, P., LE ROY, P. & MONIN, G. 1997. Phenotypic and genetic parameters for longissimus muscle fiber characteristics in relation to growth, carcass, and meat quality traits in Large White pigs. *Journal of Animal Science* 75, 3126-3137.
- LASSITER, K., OJANO-DIRAIN, C., IQBAL, M., PUMFORD, N.R., TINSLEY, N., LAY, J., LIYANAGE, R., WING, T., COOPER, M. & BOTTJE, W. 2006. Differential expression of mitochondrial and extramitochondrial proteins in lymphocytes of male broilers with low and high feed efficiency. *Poultry Science* 85, 2251-2259.
- LAW, C.M., BARKER, D.J., OSMOND, C., FALL, C.H. & SIMMONDS, S.J. 1992. Early growth and abdominal fatness in adult life. *Journal of Epidemiology and Community Health* 46, 184-186.
- LAWRENCE, T.L.J. & FOWLER, V.R. 2002. Growth of farm animals. 2^a ed. Wallingford: CABI Publishing, 384 p.

- LAWRENCE, P., KENNY, D.A., EARLEY, B., CREWS, D.H. & MCGEE, M. 2011. Grass silage intake, rumen and blood variables, ultrasonic and body measurements, feeding behavior and activity in pregnant beef heifers differing in phenotypic residual feed intake. *Journal of Animal Science* 89, 3248-3261.
- LAWRENCE, P., KENNY, D.A., EARLEY, B. & MCGEE, M. 2013. Intake of conserved and grazed grass and performance traits in beef suckler cows differing in phenotypic residual feed intake. *Livestock Science* 152, 154-166.
- LEE, H-S. 2015. Impact of maternal diet on the epigenome during *in utero* life and the developmental programming of diseases in childhood and adulthood. *Nutrients* 7, 9492-9507.
- LEE, J., KARNUAH, A.B., REKAYA, R., ANTHONY, N.B., & AGGREY, S.E. 2015. Transcriptomic analysis to elucidate the molecular mechanisms that underlie feed efficiency in meat-type chickens. *Molecular Genetics and Genomics* 290, 1673-1682.
- LEFAUCHEUR, L., LEBRET, B., ECOLAN, P., LOUVEAU, I., DAMON, M., PRUNIER, A., BILLON, Y., SELIER, P. & GILBERT, H. 2011. Muscle characteristics and meat quality traits are affected by divergent selection on residual feed intake in pigs. *Journal of Animal Science* 89, 996-1010.
- LI, F. & GUAN, L.L. 2017. Metatranscriptomic profiling reveals linkages between the active rumen microbiome and feed efficiency in beef cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 83, e00061-17.
- LIPPENS, M., ROOM, G., DE GROOTE, G. & DECUYPERE, E. 2000. Early and temporary quantitative food restriction of broiler chickens. 1. Effects on performance characteristics, mortality and meat quality. *British Poultry Science* 41, 343-354.
- LISTRAT, A., LEBRET, I., LOUVEAU, I., ASTRUC, T., BONNET, M., LEFAUCHEUR, L., PICARD, B. & BUGEON, J. 2016. How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *TheScientificWorldJournal* 2016, 3182746.

- LIU, Q., LANARI, M.C. & SCHAEFER, D.M. 1995. A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. *Journal of Animal Science* 73, 3131-3140.
- LIU, F., YIN, J., DU, M., YAN, P., XU, J., ZHU, X. & YU, J. 2009. Heat-stress-induced damage to porcine small intestinal epithelium associated with downregulation of epithelial growth factor signaling. *Journal of Animal Science* 87, 1941-1949.
- LKHAGVADORJ, S., QU, L., CAI, W., COUTURE, O.P., BARB, C.R., HAUSMAN, G.J., NETTLETON, D., ANDERSON, L.L., DEKKERS, J.C. & TUGGLE, C.K. 2010. Gene expression profiling of the short-term adaptive response to acute caloric restriction in liver and adipose tissues of pigs differing in feed efficiency. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 298, R494-R507.
- LOBLEY, G.E., SINCLAIR, K.D., GRANT, C.M., MILLER, L., MANTLE, D., CALDER, A.G., WARKUP, C.C. & MALTIN, C.A. 2000. The effects of breed and level of nutrition on whole-body and muscle protein metabolism in purebred Aberdeen Angus and Charolais beef steers. *British Journal of Nutrition* 84, 275-284.
- LONG, N.M., NIJLAND, M.J., NATHANIELSZ, P.W. & FORD, S.P. 2010. The effect of early to mid-gestational nutrient restriction on female offspring fertility and hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress. *Journal of Animal Science* 88, 2029-2037.
- LONG, N.M., TUERSUNJIANG, N., GEORGE, L.A., LEMLEY, C.O., MA, Y., MURDOCH, W.J., NATHANIELSZ, P.W. & FORD, S.P. 2013. Maternal nutrient restriction in the ewe from early to midgestation programs reduced steroidogenic enzyme expression and tended to reduce progesterone content of corpora lutea, as well as circulating progesterone in nonpregnant aged female offspring. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8, 11-34.
- LÓPEZ FARRÉ, A. & MACAYA, C. 2006. Efectos antitrombóticos y antiinflamatorios de los ácidos grasos omega-3. *Revista Española de Cardiología* 6, 31D-37D.

- LUCAS, A. 1998. Programming by early nutrition: An experimental approach. *The Journal of Nutrition* 128, 401S-406S.
- LUITING, P., SCHRAMA, J.W., VAN DER HEL, W. & URFF, E.M. 1991. Metabolic differences between White Leghorns selected for high and low residual feed consumption. *British Poultry Science* 32, 763-782.
- LUNA-PINTO, G. & CRONJÉ, P. 2000. The roles of the insulin-like growth factor system and leptin as possible mediators of the effects of nutritional restriction on age at puberty and compensatory growth in dairy heifers. *South African Journal of Animal Science* 30, 155-163.
- MALLONEE, P.G., BEEDE, D.K., COLLIER R.J. & WILCOX, C.J. 1985. Production and physiological responses of dairy cows to varying dietary potassium during heat stress. *Journal of Dairy Science* 68, 1479-1487.
- MALONE, J.H. & OLIVER, B. 2011. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biology* 9, 34.
- MANSO, T., MANTECÓN, A.R., CASTRO, T. & IASON, G.R. 1998. Effect of intake level during milk-feeding period and protein content in the post-weaning diet on performance and body composition in growing lambs. *Animal Science* 67, 513-521.
- MAPA, 2018. El sector ovino y caprino de carne en cifras. Principales indicadores económicos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible Online:
https://www.mapa.gob.es/gl/ganaderia/publicaciones/indicadoreseconomicosovinoycaprinocarne2018_tcm37-428265.pdf [Consultado el 25/01/2020].
- MAPA, 2019a. Encuesta de sacrificio de ganado. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible Online:
<https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/ganaderia/encuestas-sacrificio-Ganado/> [Consultado el 25/01/2020].
- MAPA, 2019b. Sistemas de producción y nutrición animal: Ganado ovino. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible Online:
<https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/plataforma-de-conocimiento-para-el-medio-rural-y-pesquero/observatorio-de-tecnologias->

[probadas/sistemas-prodnut-animal/ganado-ovino.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sistemas-prodnut-animal/ganado-ovino.aspx) [Consultado el 25/01/2020].

MAPAMA, 2016. Caracterización del sector ovino y caprino en España. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Disponible Online: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/caracterizaciondelsectorovino2016_def_tcm30-380879.pdf [Consultado el 25/01/2020].

MAPAMA, 2017. Definición y evaluación de estrategias de potenciación de la capacidad de interlocución y vertebración del sector de la producción ecológica de España. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Disponible Online: https://www.mapa.gob.es/ca/alimentacion/temas/produccion-ecologica/informevertebracionsectorecologicoano2016-informefinal-definitivo_tcm34-437293.pdf [Consultado el 25/01/2020].

MARTÍNEZ-CEREZOS, S., OLLETA, J.L., SAÑUDO, C., DELFA, R., CUARTIELLES, I., PARDOS, J.J., MEDEL, I., PANEA, B. & SIERRA, I. 2002. Calidad de la canal de tres razas ovinas españolas. Efecto del peso al sacrificio. *Actas de las XXVII Jornadas Científicas de la SEOC*, 288-295.

MARTÍNEZ MARÍN, A.L. 2007. Influencia de la nutrición sobre el contenido y tipo de ácidos grasos en la carne de los rumiantes. *Archivos de Zootecnia* 56, 45-66.

MARTORELL, R., STEIN, A.D. & SCHROEDER, D.G. 2001. Early nutrition and later adiposity. *The Journal of Nutrition* 131, 874S-880S.

MASAQUIZA MOPOSITA, D.A., PEREDA MOUSO, J., CURBELO RODRÍGUEZ, L.M., FIGUEREDO CALVO, R. & CERVANTES MENA, M. 2017. Intensificación de los sistemas agropecuarios y su relación con la productividad y eficiencia. Resultados con su aplicación: Artículo de Revisión. *Revista de Producción Animal* 29, 57-64.

MCDONAGH, M.B., HERD, R.M., RICHARDSON, E.C., ODDY, V.H., ARCHER, J.A. & ARTHUR, P.F. 2001. Meat quality and the calpain system of feedlot steers following a single generation of divergent selection for residual feed intake. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 41, 1013-1021.

- MCDONALD, P., EDWARDS, R.A., GREENHALGH, J.F.D., MORGAN, C.A., SINCLAIR, L.A. & WILKINSON, R.G. 2013. *Nutrición Animal*. 7ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 672 p.
- MCDONALD, J.M. & NIELSEN, M.K. 2008. Mitochondrial efficiency in lines of mice divergently selected for heat loss. *Journal of Animal Science* 86(E-Suppl. 2), 600. (Abstr.)
- MEUNIER-SALAÜN, M.C., GUÉRIN, C., BILLON, Y., SELLIER, P., NOBLET, J. & GILBERT, H. 2014. Divergent selection for residual feed intake in group-housed growing pigs: characteristics of physical and behavioural activity according to line and sex. *Animal* 8, 1898-1906.
- MEYER, A.M., CATON, J.S., HESS, B.W., FORD, S.P. & REYNOLDS, L.P. 2012. Epigenetics and effects on the neonate that may impact feed efficiency. *En: HILL, R.A. (ed.). Feed efficiency in the beef industry*. 1ª ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 199-223.
- MEYER, A.M., HESS, B.W., PAISLEY, S.I., DU, M. & CATON, J.S. 2014. Small intestinal growth measures are correlated with feed efficiency in market weight cattle, despite minimal effects of maternal nutrition during early to midgestation. *Journal of Animal Science* 92, 3855-3867.
- MIN, B. & AHN, D.U. 2005. Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products -A review. *Food Science and Biotechnology* 14, 152-163.
- MOLONEY, F., TOOMEY, S., NOONE, E., NUGENT, A., ALLAN, B., LOSCHER, C.E. & ROCHE, H.M. 2007. Antidiabetic effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid may be mediated via anti-inflammatory effects in white adipose tissue. *Diabetes* 56, 574-582.
- MONTANHOLI, Y., FONTOURA, A., SWANSON, K., COOMBER, B., YAMASHIRO, S. & MILLER, S. 2013. Small intestine histomorphometry of beef cattle with divergent feed efficiency. *Acta Veterinaria Scandinavica* 55, 9.
- MONTANHOLI, Y.R., SWANSON, K.C., PALME, R., SCHENKEL, F.S., MCBRIDE, B.W., LU, D. & MILLER, S.P. 2010. Assessing feed efficiency in beef steers through feeding behavior, infrared thermography and glucocorticoids. *Animal* 4, 692-701.

- MORÁN, L. 2013. Efecto del ácido carnósico añadido a la dieta de corderos sobre el bienestar animal y la calidad de la carne. Tesis doctoral, Universidad de León.
- MORÁN, L., ANDRÉS, S., MATEO, J., BLANCO, C., SOTO, S. & GIRÁLDEZ, F.J. 2014. Effect of dietary carnosic acid on meat quality from suckling lambs. *Small Ruminant Research* 121, 314-319.
- MORÁN, L., GIRÁLDEZ, F.J., PANSERI, S., ALDAI, N., JORDÁN, M.J., CHIESA, L.M. & ANDRÉS, S. 2013. Effect of dietary carnosic acid on the fatty acid profile and flavour stability of meat from fattening lambs. *Food Chemistry* 138, 2407-2414.
- MORGAN, J.H.L. 1972. Effect of plane of nutrition in early life on subsequent live-weight gain, carcass and muscle characteristics and eating quality of meat in cattle. *The Journal of Agricultural Science* 78, 417-423.
- MORGAN, D.K. & WHITELAW, E. 2008. The case for transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society* 19, 394-397.
- MORRISON, W.D. & LEESON, S. 1978. Relationship of feed efficiency to carcass composition and metabolic rate in laying birds. *Poultry Science* 57, 735-739.
- MORRISSEY, P.A. & KERRY, J.P. 2010. Lipid oxidation and the shelf-life of muscle foods. En: STEELE, R. (ed.). *Understanding and measuring the shelf-life of food*. Boca Raton, Florida: Woodhead Publishing Limited & CRC Press, 357-395.
- MORRISSEY, P., SHEEHY, P., GALVIN, K., KERRY, J. & BUCKLEY, D. 1998. Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science* 49, S73-S86.
- NAVARRO, V., MACARULLA, M.^aT., CHÁVARRI, M.^a, FERNÁNDEZ-QUINTELA, A., RODRÍGUEZ, V.M. & PUY PORTILLO, M. 2005. El ácido linoleico conjugado disminuye la hipercolesterolemia pero aumenta el riesgo de litiasis biliar. *Nutrición Hospitalaria* 20, 223-228.
- NIELSEN, M.K., FREKING, B.A., JONES, L.D., NELSON, S.M., VORDERSTRASSE, T.L. & HUSSEY, B.A. 1997. Divergent selection for heat loss in mice: II. Correlated responses in feed intake, body mass, body

- composition, and number born through fifteen generations. *Journal of Animal Science* 75, 1469-1476.
- NKRUMAH, J.D., OKINE, E.K., MATHISON, G.W., SCHMID, K., LI, C., BASARAB, J.A., PRICE, M.A., WANG, Z. & MOORE, S.S. 2006. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *Journal of Animal Science* 84, 145-153.
- NORDBY, D.J., FIELD, R.A., RILEY, M.L. & KERCHER, C.J. 1987. Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on growth, muscle cellularity, fiber type and carcass composition in lambs. *Journal of Animal Science* 64, 1419-1427.
- NRC (National Research Council), 1981. Effect of environment on nutrient requirements of domestic animals. Washington, DC: The National Academies Press, 152 p.
- NÜRNBERG, K., WEGNER, J. & ENDER, K. 1998. Factors influencing fat composition in muscle and adipose tissue of farm animals. *Livestock Production Science* 56, 145-156.
- ODDY, V.H., SPEC, P.A., WARREN, H.M. & WYNN, P.C. 1995. Protein metabolism in lambs from lines divergently selected for weaning weight. *The Journal of Agricultural Science* 124, 129-137.
- OHASHI, H., HASEGAWA, M., WAKIMOTO, K. & MIYAMOTO-SATO, E. 2015. Next-generation technologies for multiomics approaches including interactome sequencing. *BioMed Research International* 2015, 104209.
- OIE, 2015. Animal Health. A multifaceted challenge. Organización Mundial de Sanidad Animal. Disponible Online: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Key_Documents/ANIMAL-HEALTH-EN-FINAL.pdf [Consultado el 20/12/2019].
- OJANO-DIRAIN, C.P., PUMFORD, N.R., TOYOMIZU, M. & BOTTJE, W.G. 2007. Association of mitochondrial function and feed efficiency. *The Journal of Poultry Science* 44, 221-237.

- OKEUDO, N.J. & MOSS, B.W. 2007. Intramuscular lipid and fatty acid profile of sheep comprising four sex-types and seven slaughter weights produced following commercial procedure. *Meat Science* 76, 195-200.
- ORTIGUES-MARTY, I., CANTALAPIEDRA-HIJAR, G., VERNET, J. & NOZIÈRE, P. 2017. De l'énergie de la ration à l'utilisation des nutriments chez les ruminants: quel rôle pour les tissus splanchniques? *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 52, 45-53.
- OWENS, F.N., GILL, D.R., SECRIST, D.S. & COLEMAN, S.W. 1995. Review of some aspects of growth and development of feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 73, 3152-3172.
- PARIZA, M.W., PARK, Y. & COOK, M.E. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research* 40, 283-298.
- PARK, J.H., STOFFERS, D., NICHOLLS, R.D. & SIMMONS, R. 2008. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *Journal of Clinical Investigation* 118, 2316-2324.
- PATEL, M.S. & SRINIVASAN, M. 2002. Metabolic programming: causes and consequences. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 1629-1632.
- PEARCE, S.C., MANI, V., WEBER, T.E., RHOADS, R.P., PATIENCE, J.F., BAUMGARD, L.H. & GABLER, N.K. 2013. Heat stress and reduced plane of nutrition decreases intestinal integrity and function in pigs. *Journal of Animal Science* 91, 5183-5193.
- PÉREZ, C. 2018. Estrategias para el análisis de datos metabolómicos dirigidos al diagnóstico clínico. Tesis doctoral, Universidad de Valencia.
- PÉREZ, P., MAINO, M., TOMIC, G., MARDONES, E. & POKNIAK, J. 2002. Carcass characteristics and meat quality of Suffolk Down suckling lambs. *Small Ruminant Research* 44, 233-240.
- PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., SAYAS-BARBERÁ, M.E. & CARTAGENA-GRACIA, R. 1998. Caracterización de los parámetros de color

- de diferentes materias primas usadas en la industria cárnica. *Eurocarne* 63, 115-122.
- PETRONIS, A. 2010. Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases. *Nature* 465, 721-727.
- PICARD, B., LEFAUCHEUR, L., BERRI, C. & DUCLOS, M.J. 2002. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reproduction, Nutrition, Development* 42, 415-431.
- PITCHFORD, W.S. 2004. Genetic improvement of feed efficiency of beef cattle: What lessons can be learnt from other species. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44, 370-382.
- PLAGEMANN, A., HARDER, T., SCHELLONG, K., SCHULZ, S. & STUPIN, J.H. 2012. Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health. *Best Practices & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 26, 641-653.
- POIRIER, H., SHAPIRO, J.S., KIM, R.J. & LAZAR, M.A. 2006. Nutritional supplementation with trans-10, cis-12-Conjugated Linoleic Acid induces inflammation of white adipose tissue. *Diabetes* 55, 1634-1641.
- PONSUKSILI, S., MURANI, E., WALZ, C., SCHWERIN, M. & WIMMERS, K. 2007. Pre- and postnatal hepatic gene expression profiles of two pig breeds differing in body composition: insight into pathways of metabolic regulation. *Physiological Genomics* 29, 267-279.
- POPE, P.B., SMITH, W., DENMAN, S.E., TRINGE, S.G., BARRY, K., HUGENHOLTZ, P., MCSWEENEY, C.S., MCHARDY, A.C. & MORRISON, M. 2011. Isolation of Succinivibrionaceae implicated in low methane emissions from Tammar wallabies. *Science* 333, 646-648.
- PRESTON, T.R. & LENG, R.A. 1989. Ajustando los sistemas de producción pecuaria a los recursos disponibles: Aspectos básicos y aplicados del nuevo enfoque sobre la nutrición de rumiantes en el trópico. Cali: Condit, 312 p.
- RAATZ, S.K., TORKELOSON, C.J., REDMON, J.B., RECK, K.P., KWONG, C.A., SWANSON, J.E., LIU, C., THOMAS, W. & BANTLE, J.P. 2005. Reduced

- glycemic index and glycemic load diets do not increase the effects of energy restriction on weight loss and insulin sensitivity in obese men and women. *The Journal of Nutrition* 135, 2387-2391.
- RAE, M.T., KYLE, C.E., MILLER, D.W., HAMMOND, A.J., BROOKS, A.N. & RHIND, S.M. 2002. The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Animal Reproduction Science* 72, 63-71.
- RANDALL, D., BURGGREN, W. & FRENCH, K. 1998. Fisiología Animal. Mecanismos y Adaptaciones. 4ª ed. Madrid: McGraw-Hill, 795 p.
- RASBY, R.J., WETTEMANN, R.P., HARMS, P.G., LUSBY, K.S. & WAGNER, J.J. 1992. GnRH in the infundibular stalk-median eminence is related to percentage body fat in carcasses of beef cows. *Domestic Animal Endocrinology* 9, 71-76.
- RAUW, W.M. 2012. Immune response from a resource allocation perspective. *Frontiers in Genetics* 3, 267.
- RAUW, W.M., KANIS, E., NOORDHUIZEN-STASSEN, E.N. & GROMMERS, F.J. 1998. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livestock Production Science* 56, 15-33.
- REHFELDT, C., FIEDLER, I., DIETL, G. & ENDER, K. 2000. Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. *Livestock Production Science* 66, 177-188.
- RENAUDEAU, D., COLLIN, A., YAHAV, S., DE BASILIO V., GOURDINE, J.L. & COLLIER, R.J. 2012. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal* 6, 707-728.
- RHIND, S.M., ELSTON, D.A., JONES, C.R., REES, M.E., MCMILLEN, S.R. & GUNN, R.G. 1998. Effects of restriction of growth and development of Brecon Cheviot ewe lambs on subsequent lifetime reproductive performance. *Small Ruminant Research* 30, 121-126.
- RHOADS, M.L., RHOADS, R.P., VANBAALE, M.J., COLLIER, R.J., SANDERS, S.R., WEBER, W.J., CROOKER, B.A. & BAUMGARD, L.H. 2009. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production,

- metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *Journal of Dairy Science* 92, 1986-1997.
- RICHARDSON, E.C., 2003. Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. Tesis doctoral, University of New England, Armidale.
- RICHARDSON, E.C. & HERD, R.M. 2004. Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 2. Synthesis of results following divergent selection. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44, 431-440.
- RICHARDSON, E.C., HERD, R.M., ARCHER, J.A., WOODGATE, R.T. & ARTHUR, P.F. 1998. Steers bred for improved net feed efficiency eat less for the same feedlot performance. *Animal Production in Australia* 22, 213-216.
- RICHARDSON, E.C., HERD, R.M., ARTHUR, P.F., WRIGHT, J., XU, G., DIBLEY, K. & ODDY, V.H. 1996. Possible physiological indicators for net feed conversion efficiency in beef cattle. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production* 21, 103-106.
- RICHARDSON, E.C., KILGOUR, R.J., ARCHER, J.A. & HERD, R.M. 1999. Pedometers measure differences in activity in bulls selected for high or low net feed efficiency. *Proceedings of the Australian Society for the Study of Animal Behaviour* 26, 16. (Abstr.)
- ROBINSON, J.J. 1996. Nutrition and reproduction. *Animal Reproduction Science* 42, 25-34.
- ROBINSON, J.J., ASHWORTH, C.J., ROOKE, J.A., MITCHELL, L.M. & MCEVOY, T.G. 2006. Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Animal Feed Science and Technology* 126, 259-276.
- ROBINSON, D.L. & ODDY, V.H. 2004. Genetic parameters for feed efficiency, fatness, muscle area and feeding behavior of feedlot finished beef cattle. *Livestock Production Science* 90, 255-270.
- ROBINSON, J.J., ROOKE, J.A. & MCEVOY, T.G. 2002. Nutrition for conception and pregnancy. En: FREER, M. & DOVE, H. (eds.). *Sheep Nutrition*. Wallingford: CABI Publishing, 189-211.

- ROCHE, H.M., NOONE, E., NUGENT, A. & GIBNEY, M.J. 2001. Conjugated linoleic acid: a novel therapeutic nutrient? *Nutrition Research Reviews* 14, 173-187.
- RODRÍGUEZ, A.B., BODAS, R., LANDA, R., LÓPEZ-CAMPOS, Ó., MANTECÓN, A.R. & GIRÁLDEZ, F.J. 2011. Animal performance, carcass traits and meat characteristics of Assaf and Merino×Assaf growing lambs. *Livestock Science* 138, 13-19.
- RODRÍGUEZ, A.B., LANDA, R., BODAS, R., PRIETO, N., MANTECÓN, A.R. & GIRÁLDEZ, F.J. 2008. Carcass and meat quality of Assaf milk fed lambs: Effect of rearing system and sex. *Meat Science* 80, 225-230.
- ROSALES NIETO, C.A., FERGUSON, M.B., MACLEAY, C.A., BRIEGEL, J.R., MARTIN, G.B. & THOMPSON, A.N. 2013. Selection for superior growth advances the onset of puberty and increases reproductive performance in ewe lambs. *Animal* 7, 990-997.
- ROSEBOOM, T.J., PAINTER, R.C., VAN ABEELLEN, A.F., VEENENDAAL, M.V. & DE ROOIJ, S.R. 2011. Hungry in the womb: what are the consequences? Lessons from the Dutch famine. *Maturitas* 70, 141-145.
- RUCHAT, S-M., BOUCHARD, L. & HIVERT, M-F. 2014. Early infant nutrition and metabolic programming: What are the potential molecular mechanisms? *Current Nutrition Reports* 3, 281-288.
- SAMI, A.S., AUGUSTINI, C. & SCHWARZET, F.J. 2004. Effects of feeding intensity and time on feed on performance, carcass characteristics and meat quality of Simmental bulls. *Meat Science* 67, 195-201.
- SÁNCHEZ, M., GIL, J. & GRACIA, A. 2000. Segmentación del consumidor respecto al alimento ecológico: diferencias interregionales. *Revista de Estudios Regionales* 56, 153-164.
- SANTANA, M.H.A., GOMES, R.C., FERRAZ, J.B.S. & ROSSI JUNIOR, P. 2014. Medidas de eficiência alimentar para avaliação de bovinos de corte. *Scientia Agraria Paranaensis* 13, 95-107.

- SAÑUDO, C. 2006. Calidad de la canal y de la carne en los ovinos: factores que la determinan (Conferencia). *Revista Argentina de Producción Animal* 26, 155-167.
- SAÑUDO, C. 2008. Calidad de la canal y de la carne ovina y caprina y los gustos de los consumidores. *Revista Brasileira de Zootecnia* 37, 143-160.
- SAÑUDO, C., CEPERO, R. & SIERRA, I. 2009. Ovinotecnia: producción y economía en la especie ovina: homenaje al profesor Isidro Sierra Alfranca. Zaragoza: Prensas Universitarias de Zaragoza, 494 p.
- SAÑUDO, C., SANCHEZ, A. & ALFONSO, M. 1998. Small ruminant production systems and factors affecting lamb meat quality. *Meat Science* 49(Suppl. 1), S29-S64.
- SARO, C., MATEO, J., ANDRÉS, S., VALDÉS, C., LÓPEZ, S. & GIRÁLDEZ, F.J. 2019. Relación entre la eficiencia alimentaria y las características de la canal y de la carne en corderos pesados de raza assaf. *X Congreso Nacional CyTA/CESIA*, 265.
- SAUVANT, D. & NOZIÈRE, P. 2016. Quantification of the main digestive processes in ruminants: the equations involved in the renewed energy and protein feed evaluation systems. *Animal* 10, 755-770.
- SCHILLO, K.K. 1992. Effects of dietary energy on control of luteinizing-hormone secretion in cattle and sheep. *Journal of Animal Science* 70, 1271-1282.
- SCHOONMAKER, J.P., CECAVA, M.J., FLUHARTY, F.L., ZERBY, H.N. & LOERCH, S.C. 2004. Effect of source and amount of energy and rate of growth in the growing phase on performance and carcass characteristics of early- and normal-weaned steers. *Journal of Animal Science* 82, 273-282.
- SECOND WHITE PAPER OF THE ANIMAL TASK FORCE, 2016. A strategic research and innovation agenda for a sustainable livestock sector in Europe. Disponible Online: http://www.animaltaskforce.eu/Portals/0/2nd%20White%20Paper/ATF-2nd%20whitepaper_final.pdf [Consultado el 20/01/2020].

- SHABAT, S.K., SASSON, G., DORON-FAIGENBOIM, A., DURMAN, T., YAACOBY, S., BERG MILLER, M.E., WHITE, B.A., SHTERZER, N. & MIZRAHI, I. 2016. Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. *International Society for Microbial Ecology Journal* 10, 2958-2972.
- SHAFFER, K.S., TURK, P., WAGNER, W.R. & FELTON, E.E.D. 2011. Residual feed intake, body composition, and fertility in yearling beef heifers. *Journal of Animal Science* 89, 1028-1034.
- SILVEIRA RODRÍGUEZ, M-B., MARTÍNEZ-PIÑEIRO MUÑOZ, L. & CARRARO CASIERI, R. 2007. Nutrigenómica, obesidad y salud pública. *Revista Española de Salud Pública* 81, 475-487.
- SIMOPOULOS, A.P. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine* 233, 674-688.
- SINCLAIR, K.D., RUTHERFORD, K.M., WALLACE, J.M., BRAMELD, J.M., STÖGER, R., ALBERIO, R., SWEETMAN, D., GARDNER, D.S., PERRY, V.E., ADAM, C.L., ASHWORTH, C.J., ROBINSON, J.E. & DWYER, C.M. 2016. Epigenetics and developmental programming of welfare and production traits in farm animals. *Reproduction, Fertility and Development* 28, 1443-1478.
- SLOBODA, D.M., HOWIE, G.J., PLEASANTS, A., GLUCKMAN, P.D. & VICKERS, M.H. 2009. Pre- and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the rat. *PLoS One* 4, e6744.
- ST-PIERRE, N., COBANOV, R.B. & SCHNITKEY, G. 2003. Economic losses from heat stress by US livestock industries. *Journal of Dairy Science* 86, E52-E77.
- SURAVAJHALA, P., KOGELMAN, L.J. & KADARMIDEEN, H.N. 2016. Multi-omic data integration and analysis using systems genomics approaches: methods and applications in animal production, health and welfare. *Genetics, Selection, Evolution* 48, 38.
- SZYF, M. 2009. The early life environment and the epigenome. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790, 878-885.

- THOMSON, E.F., BICKEL, H. & SCHURCH, A. 1982. Growth performance and metabolic changes in lambs and steers after mild nutritional restriction. *The Journal of Agricultural Science* 98, 183-194.
- TIZIOTO, P.C., COUTINHO, L.L., DECKER, J.E., SCHNABEL, R.D., ROSA, K.O., OLIVEIRA, P.S.N., SOUZA, M.M., MOURÃO, G.B., TULLIO, R.R., CHAVES, A.S., LANNA, D.P.D., ZERLOTINI-NETO, A., MUDADU, M.A., TAYLOR, J.F. & REGITANO, L.C.A. 2015. Global liver gene expression differences in Nelore steers with divergent residual feed intake phenotypes. *BMC Genomics* 16, 242.
- TOMAS, F.M., PYM, R.A. & JOHNSON, R.J. 1991. Muscle protein turnover in chickens selected for increased growth rate, food consumption or efficiency of food utilisation: Effects of genotype and relationship to plasma IGF-I and growth hormone. *British Poultry Science* 32, 363-376.
- UNITED NATIONS, 2019. World Population Prospects 2019. Department of Economic and Social Affairs, Population Division. Disponible Online: <https://population.un.org/wpp/Publications/> [Consultado el 14/05/2020].
- VALASI, I., CHADIO, S., FTHENAKIS, G.C. & AMIRIDIS, G.S. 2012. Management of prepubertal small ruminants: physiological basis and clinical approach. *Animal Reproduction Science* 130, 126-134.
- VICENTE, S. 2015. Identificación no invasiva de biomarcadores de endometriosis mediante metabolómica por RMN. Tesis doctoral, Universidad de Valencia.
- VICKERS, M.H., GLUCKMAN, P.D., COVENY, A.H., HOFMAN, P.L., CUTFIELD, W.S., GERTLER, A., BREIER, B.H. & HARRIS, M. 2005. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 146, 4211-4216.
- VICKERS, M.H., GLUCKMAN, P.D., COVENY, A.H., HOFMAN, P.L., CUTFIELD, W.S., GERTLER, A., BREIER, B.H. & HARRIS, M. 2008. The effect of neonatal leptin treatment on postnatal weight gain in male rats is dependent on maternal nutritional status during pregnancy. *Endocrinology* 149, 1906-1913.
- VINCENT, A., LOUVEAU, I., GONDRET, F., TRÉFEU, C., GILBERT, H. & LEFAUCHEUR, L. 2015. Divergent selection for residual feed intake affects the

- transcriptomic and proteomic profiles of pig skeletal muscle. *Journal of Animal Science* 93, 2745-2758.
- WADDINGTON, C.H. 2012. The epigenotype. 1942. *International Journal of Epidemiology* 41, 10-13.
- WADHWA, P.D., BUSS, C., ENTRINGER, S. & SWANSON, J.M. 2009. Developmental origins of health and disease: Brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Seminars in Reproductive Medicine* 27, 358-68.
- WARREN, W.P., MARTZ, F.A., ASAY, K.H., HILDERBRAND, E.S., PAYNE, C.G. & VOGT, J.R. 1974. Digestibility and rate of passage by steers fed tall fescue, alfalfa and orchardgrass hay in 18 and 32 C ambient temperatures. *Journal of Animal Science* 39, 93.
- WILLIAMS, A.H. 1984. Long term effects of nutrition of ewe lambs in the neonatal period. *En: LINDSAY, D.R. & PEARCE, D.T. (eds.). Reproduction in Sheep*. Canberra: Australian Academic Science & Australian Wool Corporation, 272-273.
- WOOD, J.D., BROWN, S.N., NUTE, G.R., WHITTINGTON, F.M., PERRY, A.M., JOHNSON, S.P. & ENSER, M. 1996. Effects of breed, feed level and conditioning time on the tenderness of pork. *Meat Science* 44, 105-112.
- WOOD, J.D. & ENSER, M. 1997. Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *British Journal of Nutrition* 78(Suppl. 1), S49-S60.
- WOODS, S.C. & GIBBS, J. 1989. The regulation of food intake by peptides. *Annals of the New York Academy of Sciences* 575, 236-243.
- WILSON, P. & OSBOURNE, D. 1960. Compensatory growth after under nutrition in mammals and birds. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 35, 324-363.
- YAMBAYAMBA, E., PRICE, M. & FOXCROFT, G. 1996. Hormonal status, metabolic changes, and resting metabolic rate in beef heifers undergoing compensatory growth. *Journal of Animal Science* 74, 57-69.

- YAN, X., ZHU, M.J., DODSON, M.V. & DU, M. 2013. Developmental programming of fetal skeletal muscle and adipose tissue development. *Journal of Genomics* 1, 29-38.
- YATES, J.R. 3rd. 1998. Mass spectrometry and the age of the proteome. *Journal of Mass Spectrometry* 33, 1-19.
- YOUNG, J.M, BERGSMA, R., KNOL, E.F., PATIENCE, J.F. & DEKKERS, J.C.M. 2010. Effect of selection for residual feed intake on sow reproductive performance and lactation efficiency. *Proceedings of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, 223.
- YOUNG, J.M., BERGSMA, R., KNOL, E.F., PATIENCE, J.F. & DEKKERS, J.C.M. 2016. Effect of selection for residual feed intake during the grow/finish phase of production on sow reproductive performance and lactation efficiency. *Journal of Animal Science* 94, 4120-4132.
- ZHAN, X.A., WANG, M., REN, H., ZHAO, R.Q., LI, J.X. & TAN, Z.L. 2007. Effect of early feed restriction on metabolic programming and compensatory growth in broiler chickens. *Poultry Science* 86, 654-660.
- ZHANG, X., WANG, W., MO, F., LA, Y., LI, C. & LI, F. 2017. Association of residual feed intake with growth and slaughtering performance, blood metabolism, and body composition in growing lambs. *Science Reports* 7, 12681.
- ZHANG, D., ZHANG, X., LI, F., LI, C., LA, Y., MO, F., LI, G., ZHANG, Y., LI, X., SONG, Q., ZHAO, Y. & WANG, W. 2019. Transcriptome analysis identifies candidate genes and pathways associated with feed efficiency in Hu sheep. *Frontiers in Genetics* 10, 1183.
- ZHOU, M., HERNANDEZ-SANABRIA, E. & GUAN L.L. 2009. Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6524-6533.
- ZHOU, M., HERNANDEZ-SANABRIA, E. & GUAN, L.L. 2010. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 3776-3786.

ZHOU, L., LINGDONG, F., SUN, Y., SU, Y. & ZHU, W. 2016. Effects of the dietary protein level on the microbial composition and metabolomic profile in the hindgut of the pig. *Anaerobe* 38, 61-69.

ZHU, M.J., FORD, S.P., MEANS, W.J., HESS, B.W., NATHANIELSZ, P.W. & DU, M. 2006. Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *The Journal of Physiology* 575, 241-250.

Capítulo I

Feed efficiency and the liver proteome of fattening lambs
are modified by feed restriction during the suckling
period

Publicado en: *Animal*

Feed efficiency and the liver proteome of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period

A. Santos¹, C. Valdés¹, F. J. Giráldez¹, S. López¹, J. France², J. Frutos¹, M. Fernández¹ and S. Andrés^{1†}

¹Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), Finca Marzanas, E-24346, Grulleros, León, Spain; ²Department of Animal Biosciences, Centre for Nutrition Modelling, University of Guelph, Guelph, ON, Canada, N1G 2W1

(Received 15 June 2017; Accepted 20 December 2017)

The present study was designed to describe the effects of early feed restriction of Merino lambs on feed efficiency during the fattening period by examining ruminal microbiota and fermentation parameters, gastrointestinal morphology, digestibility or liver proteome. In total, 24 male Merino lambs were randomly assigned to two experimental treatments (n = 12 per treatment). Lambs of the first group (ad libitum (ADL)) were kept permanently with the dams, whereas the other 12 lambs (restricted (RES)) were milk restricted. When lambs reached a live BW (LBW) of 15 kg, all the animals were offered the same complete pelleted diet (35 g dry matter/kg LBW per day) until slaughter at a LBW of 27 kg. The RES lambs showed poorer feed efficiency during the fattening period when compared with the ADL group (feed to gain ratio, 3.69 v. 3.05, P < 0.001). No differences were observed in ruminal microbiota, fermentation parameters or apparent digestibility. However, the proportion of the small intestine and the length of ileal villi were reduced in the RES lambs. In total, 26 spots/proteins were identified in the liver proteomic profile, with significant differences (P < 0.05) between experimental treatments, suggesting a higher catabolism of proteins and a reduction in β -oxidation of fatty acids in RES lambs when compared with the ADL animals. In conclusion, early feed restriction of Merino lambs during the suckling period promotes long-term effects on the small intestine and the proteomic profile of the liver, which may influence the metabolic use of nutrients, thus negatively affecting feed efficiency during the fattening phase.

Keywords: feed restriction, feed efficiency, metabolic programming, lamb, liver proteome

Implications

Early feed restriction during the suckling period of lambs promotes differences in both the gastrointestinal morphology and the liver proteome, thus impairing feed efficiency during the subsequent fattening period. This information will be useful to improve feed efficiency of milk-restricted lambs (e.g. due to udder problems, lack of lamb vitality and low milk production) by reducing the amount of feedstuff consumed by the animal during the fattening period to produce 1 kg of meat. This will enhance farm profitability and may have a positive environmental impact.

Introduction

The increasing world population has made the efficient use of resources progressively more important. In the livestock sector, this could be achieved by reducing the feed to gain ratio or 'feed conversion rate' (FCR, defined as the amount of feed needed to produce 1 unit of animal product) which would also reduce the environmental impact of animal

farming. As far as lamb production is concerned, a decrease of up to 15% in dry matter intake (DMI) between efficient and inefficient animals to reach a similar target BW has been demonstrated (de Paula *et al.*, 2013).

Among the various factors that promote long-term effects on the efficiency and health of animals, prenatal (pregnancy) and early postnatal nutrition (milk consumption) have been postulated as key factors in 'early nutritional programming' (Gotoh, 2015). It has been demonstrated in different species that nutrition of the pregnant dam modifies gene expression in several organs and tissues of the offspring, thus affecting both the digestive and metabolic utilisation of nutrients over the lifespan (Bell and Greenwood, 2016). Studies of the effects of nutrition during the neonatal period of lambs are scarce but some (Davies and Owen, 1967; Greenwood *et al.*, 2004; Galvani *et al.*, 2014) have revealed an open window during this early stage of life where the milk intake level generates long-term effects on feed efficiency. However, the underlying mechanisms responsible for the differences in feed efficiency, which might be multifactorial (e.g. differences in digestion, absorption or metabolic use of absorbed nutrients, as well as modifications in gene expression or

† E-mail: sonia.andres@eae.csic.es

activation of the immune response), are not completely understood (Meyer *et al.*, 2012; Gotto, 2015).

Improving our understanding of these mechanisms will be necessary to produce more efficient animals. For example, the modern molecular – OMIC tools (i.e. epigenomics, transcriptomics, proteomics or metabolomics) are increasing our understanding of the cascade from genes to phenotypes and allow differences in gene expression to be detected (Tizioto *et al.*, 2015). Since the liver plays a major role in the metabolism of nutrients and other dietary substances, thus governing body energy and protein metabolism (Rui, 2014; Santos *et al.*, 2017), it can be considered a key metabolic organ to be studied with the use of transcriptomics and/or proteomic approaches to better understand the molecular mechanisms triggered by early feed restriction. In fact, some recent studies (Alexandre *et al.*, 2015; Tizioto *et al.*, 2015) have identified that mitochondrial dysfunctions are at least partially responsible for differences in feed efficiency. However, the reasons for these differences, which might be partially related to early nutritional events and nutritional programming, were not ascertained.

The present study focuses on the effects of the early postnatal nutrition period of Merino lambs, and was designed to elicit the long-term effects promoted by feed restriction during the suckling period on feed efficiency during the fattening phase, in an attempt to clarify the underlying mechanisms related to digestion, absorption or metabolic use of nutrients, applying a liver proteomic approach for the final aspect.

Material and methods

All handling practices followed the recommendations of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes and the IGM-CSIC Animal Experimentation Committee (protocol number 2015-04).

Animals and diets

In total, 24 male Merino lambs, penned individually with their corresponding ewe during the suckling period, were used in this experiment. The lambs were stratified based on live BW (LBW) at birth (average 4.81 ± 0.256 kg) and randomly allocated to one of two experimental treatments ($n = 12$ per dietary treatment) during the suckling period. In the first group, lambs (*ad libitum* (ADL)) were kept permanently with the dams, whereas the other 12 lambs (restricted (RES)) were separated from the dams from 0900 to 1800 h. At 1700 h, the dams of RES lambs were milked and injected with oxytocin to remove alveolar milk. All the lambs were weighed twice a week throughout the suckling period.

Each lamb was weaned progressively at a LBW of 13.5 kg, restricting the suckling time to 2 h with free access to a complete pelleted diet (CPD) and alfalfa until the LBW was 15 kg. At this weight (15 kg), each weaned lamb was penned individually and offered the same CPD at a restricted level (35 g/kg LBW per day) to ensure no variations in DMI during

Table 1 *Ingredients and chemical composition (g/kg dry matter (DM) unless otherwise stated) of the complete pelleted diet administered during the fattening period of Merino lambs*

Ingredients (g/kg)	
Barley	433
Corn	150
Soyabean meal 44	237
Barley straw	150
Sodium chloride	20
Sodium bicarbonate	10
Chemical composition (g/kg DM)	
DM (g/kg)	900
NDF	227
ADF	121
CP	174
Fat	30
Ash	68
Metabolisable energy (kcal/kg)	2464

the fattening phase. Fresh drinking water was always available. All the lambs received the CPD once a day at 0900 h; the daily amount of feed offered was adjusted twice a week on the basis of LBW. Leftovers (if any) were collected daily, pooled in weekly composites for each animal, and analysed for dry matter (DM) content. Samples of the CPD offered were collected weekly and analysed for DM (ISO 6496:1999), ash (ISO 5984:2002), CP (ISO 5983:2009), NDF (Ankom Technology Corp., Macedon, NY, USA), ADF (Ankom Technology Corp.) and total fat (Acid Hydrolysis Filter Bag Technique using the Ankom^{HCl} Hydrolysis System). Ingredients and chemical composition of the CPD administered are summarised in Table 1.

Determination of digestibility

Digestibility was determined using acid insoluble ash (AIA) as an internal marker. Feed and faeces were sampled for 9 days starting when each animal reached a LBW of 20 kg. Samples of offered feed were taken daily from the 1st to the 7th day of the collection period; daily rectal grab samples were collected once a day before the morning meal for the last 7 days of the collection period. Samples of feed and faeces of each animal were weighed and pooled to form composite samples and stored at -30°C until AIA analysis (Van Keulen and Young, 1977).

Slaughter procedure, ruminal sampling and histological examination of intestinal mucosa

All lambs were slaughtered after a fattening period of at least 50 days with a target LBW of 27 kg. Feed was withdrawn 6 h before slaughtering; the lambs were then weighed, stunned, slaughtered by exsanguination from the jugular vein, eviscerated and skinned. The weight of the organs of each animal was registered, fat depots being removed before weighing the different segments of the gut. A piece of liver was cut and kept at -80°C until fat content determination (AOAC, 2003). A second piece of liver was excised, stabilised

with RNA_{later} (Ambion Inc., Austin, TX, USA) overnight at 4°C, and stored at –80°C for proteomic analysis.

Total rumen contents from each lamb were removed, mixed and sampled within 30 min of slaughter. Samples were collected in aseptic flasks, immediately frozen at –80°C for 48 h, freeze-dried, and stored at –20°C until DNA extraction for microbial diversity analysis as described in Andrés *et al.* (2016). In addition, about 200 g of ruminal contents were strained through two layers of cheesecloth and the pH was measured immediately. Subsequently, 40 ml of ruminal liquid was dispensed into a falcon tube with 1 ml of 20% sulphuric acid solution to acidify the medium and stop the fermentation. Fermentation end-products (volatile fatty acids, ammonia nitrogen and lactate) were determined according to Carro and Miller (1999).

A piece of the small intestine was removed from each animal, 20 cm from the pylorus, and placed in a 10% formaldehyde solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for histological examination (fixed by immersion in 10% buffered formalin for 1 week). Formalin-fixed samples from the ileum were trimmed and processed for paraffin embedding and histologic examination (haematoxylin–eosin staining). Slides were examined with a Leica microscope and 10 pictures from 10 different microscopic fields (selected at random from representative areas and damaged villi areas were rejected) per animal were taken at 40× magnification (eyepiece, 10×; objective lens, 4×). The heights of 40 villi were measured using the image processing and analysis software ImageJ v1.6.0_14 (National Institutes of Health, USA). The villus height was defined as the distance between the top of the villus and the crypt transition (Makovicky *et al.*, 2014).

DNA extraction, quantitative real-time PCR and terminal restriction fragment length polymorphism of ruminal microbiota

Frozen samples of total rumen contents were freeze-dried and thoroughly homogenised before DNA extraction by physical disruption (1 min) using a bead beater (Mini-bead Beater; BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) and subsequent DNA purification with the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), with the modification of a greater temperature (95°C) to improve cell lysis. Deoxyribonucleic acid samples were used as templates for quantitative real-time PCR (qPCR) amplification and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis according to the procedures described by Andrés *et al.* (2016), except with the use of *MspI* as the restriction enzyme. Additionally, to quantify total bacteria, qPCR was performed as previously described (Andrés *et al.*, 2016), whereas the primers and qPCR details for *Megasphaera elsdenii* (Ouwkerk *et al.*, 2002), *Prevotella* spp., *Selenomonas ruminantium* (Stevenson and Weimer, 2007) and methanogens (Denman *et al.*, 2007) can be found in the corresponding references. Results were expressed as fold change (\log_2 of number of copies per milligram of genomic DNA (RES/ADL)) of overrepresented species in ruminal microbial content (positive value if RES/ADL > 1; negative value if ADL/RES > 1).

Proteomic analysis of liver samples

For this procedure, four representative animals from each group were selected to cover the complete range of values of average daily gain during the fattening period in each group, and avoiding differences in BW between groups. Liver samples were homogenised in 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 7.4, containing 0.07% 1,4-dithiothreitol (DTT) and supplemented with the cOmplete™ protease inhibitor cocktail; Roche Applied Science, Vilvoorde, Belgium) with the FastPrep® Instrument (MP Biomedicals, Illkirch, France) and LysisMatrix D and centrifuged (15 700 × g, 4°C, 30 min) for clarification. An additional step for the removal of insoluble material by ultracentrifugation of samples at 157 000 × g at 4°C for 4 h was applied. Protein supernatants were then mixed with an equal volume of pre-chilled 20% (w/v) 2,2,2-trichloroacetic acid/acetone containing 0.14% (w/v) DTT and incubated overnight at –20°C for protein precipitation. Precipitated proteins were separated by 3900 × g centrifugation for 5 min at 4°C. The pellet was washed twice with pre-chilled acetone containing 0.07% (w/v) DTT and once with 80% (v/v) acetone/MilliQ water. Protein concentration was determined with the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), which showed a high reproducibility for this protein extraction protocol. The final pellet was re-suspended in a rehydration solution containing 8 M urea, 2% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 0.5% (v/v) ampholytes, 25 mM DTT and 0.002% bromophenol blue. Samples were additionally processed using the 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) for salt removal, according to the manufacturer's instructions, quantified again with Bradford assay, and stored at –80°C or applied directly to 18 cm immobilised pH gradient (IPG) strips before proteome resolution.

An active rehydration protocol for the first-dimension strips (450 µg of protein) was applied, followed by isoelectric focusing steps (non-linear gradient of pH 3 to 10) onto an Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System (GE Healthcare) maintained at 20°C. Proteins resolved in the first-dimension strips were reduced and alkylated before second-dimensional electrophoresis. The second dimension was run in 12.5% to 15% SDS-PAGE in an Ettan Dalt Six apparatus (GE Healthcare) for 45 min at 3 W/gel and then for 4 h at 18 W/gel. Precision Plus Protein Standards (BioRad Laboratories) were used as markers. High sensitivity Colloidal Coomassie Blue G-250 Staining (blue silver) was used for protein visualisation.

All gels (two gels per sample, eight gels per condition) were scanned using an ImageScanner III (GE Healthcare), and images were analysed with the ImageMaster 2D Platinum software (GE Healthcare). The internal standard image with more spots was designated as the 'Master,' and was used as a template. Protein spots included in the rest of the images were matched to those in the Master to assure an accurate comparison. The intensity of individual spots was normalised and images (the best gel per sample, four gels per condition) were grouped. The intensity of individual spots was analysed

and compared with other spots within and between image groups. Differential representation of protein spots was determined by Student's *t* test. Spots showing a *P*-value \leq 0.05 with a fold change \geq 1.5 were chosen for identification.

The protein spots of interest were manually excised, digested with trypsin and extracted for MALDI-TOF/TOF tandem MS analysis (4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Names of the proteins differentially accumulated in the liver of both groups of lambs were assigned according to the NCBI RefSeq annotation of the genes (GCF_000298735.2_Oar_v4.0), whereas the Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG) annotation (retrieved from the KEGG website) was used to assign proteins to specific metabolic pathways. Identification of a certain protein was considered correct if the score was higher than 93 (protein score $>$ 93; *P* < 0.05). If more than one protein was identified in one spot, the protein with the highest score was selected.

Calculations and statistical analysis

Average daily gain (ADG, g/day) was estimated as the regression coefficient (slope) of BW against time using the REG procedure of the SAS statistical package (2011, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The feed to gain ratio or 'FCR' was obtained by dividing the DMI per day by the previously estimated ADG during the fattening period (g DMI/g ADG). Growth performance data together with organ weights, fat depots, ruminal fermentation parameters, microbiota, digestibility and histology examination of the ileal mucosa were analysed by one-way ANOVA using the GLM procedure of SAS with feeding regime (*ad libitum* or restricted during the suckling period) as the only source of variation. The individual lamb was considered as the experimental unit. Significance was declared at *P* < 0.05. The T-RFLP data obtained for each rumen sample were analysed by principal component analysis using SAS.

Results

Animal performance, digestibility, and ruminal fermentation and microbiota

Body weight at birth, at weaning and at slaughter were unaffected (*P* > 0.05) by dietary treatment (Table 2). As expected, the ADG of RES lambs was reduced during the suckling period (191 v. 267 g/day for RES and ADL lambs, respectively; *P* < 0.010). Moreover, the ADG during fattening (from weaning to slaughter) was 164 v. 202 g/day for RES and ADL lambs, respectively (*P* < 0.001), even though there were no differences in DMI between both groups (35 g/kg LBW per day) at this phase (*P* > 0.05). Thus, the fattening period was longer for the RES lambs (62 v. 74 days, *P* < 0.001) to reach target LBW at slaughter (27 kg LBW). As a consequence, the feed to gain ratio was increased in RES lambs compared with the ADL lambs (*P* < 0.05). However, digestibility during the fattening period was unaffected (*P* > 0.05) by early feed restriction. Neither fermentation end-products nor ruminal microbiota (T-RFLP, data not

Table 2 Effect of early feed restriction during the suckling period (*ad libitum* (ADL) v. early fed restricted lambs (RES)) on pre- and post-weaning growth performance of lambs, digestibility of the diet fed during the fattening period and rumen fermentation parameters

	ADL	RES	RSD	<i>P</i> -value
Birth weight (kg)	5.02	4.61	0.980	0.280
Weaning weight (kg)	15.2	15.2	0.310	0.682
Slaughter weight (kg)	27.4	27.3	0.487	0.710
ADG (g/day)				
Birth–weaning	267	191	41.2	< 0.001
Weaning–slaughter	202	164	25.0	0.002
Days				
Birth–weaning (15 kg LBW)	42	55	8.4	0.010
Weaning–slaughter (27 kg LBW)	62	74	7.7	< 0.001
DMI during fattening period (g/day)	603	607	25.9	0.703
Feed to gain ratio (g DMI/g ADG ¹)	3.05	3.69	0.369	< 0.001
Digestibility (%)				
Dry matter	71.1	71.9	2.54	0.440
Organic matter	73.0	73.8	2.46	0.394
Rumen pH and fermentation end-products				
pH	6.57	6.59	0.219	0.782
Total VFA (mmol/l)	52.6	51.4	12.82	0.825
Molar proportions (mmol/100 mmol VFA)				
Acetate	49.0	50.4	4.60	0.480
Propionate	29.7	30.8	3.40	0.414
Butyrate	10.6	8.47	3.905	0.190
Valerate	3.88	1.83	0.805	0.259
Isovalerate	3.50	1.77	0.766	0.981
Isobutirate	2.59	2.82	0.564	0.325
Caproate	0.83	0.66	0.383	0.362
NH ₃ -N (mg/l)	286	269	100.5	0.684
Lactate (mg/l)	122	124	46.5	0.924

ADG = average daily gain; LBW = live BW; DMI = dry matter intake; AVG = Average daily gain; VFA = volatile fatty acids; NH₃-N = ammonia nitrogen; RSD = residual standard deviation.

¹Average daily gain during the fattening period (weaning–slaughter).

shown; qPCR, Figure 1) showed differences (*P* > 0.05) between dietary treatments.

Visceral organ weight, fat depots and histological structure of intestinal mucosa

As shown in Table 3, visceral organ weights at slaughter were unaffected (*P* > 0.05) by early feed restriction during the suckling period, with the exception of the heart, which was greater (*P* < 0.05) in RES (179 g) compared with ADL lambs (155 g). On the other hand, although there were no differences (*P* > 0.05) in small, large or total intestine weights, the small intestine represented a smaller (*P* < 0.05) fraction of the total intestine in RES lambs (66.0%) compared with ADL lambs (69.3%). The average villus height in the ileal epithelium was shorter (*P* < 0.05) in RES compared with ADL lambs (465.6 v. 487.3 μ m). In addition, liver, omental and perirenal fat were significantly greater in RES compared

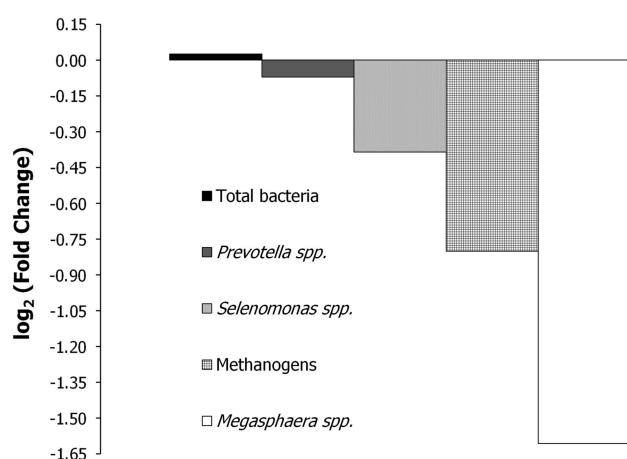


Figure 1 Relative quantitation compared with *ad libitum* lambs (ADL) of 16S ribosomal RNA copy numbers of microbiota groups in the ruminal contents of early fed restricted Merino lambs (RES) during the suckling period. Fold-changes for specific amplicon groups calculated as \log_2 ratio of normalised abundances. Positive value if RES/ADL > 1; negative value if ADL/RES > 1. No significant difference in copy number ($P > 0.05$) calculated using Tukey's test (SAS) were observed.

Table 3 Effect of early feed restriction during the suckling period (*ad libitum* (ADL) v. early fed restricted lambs (RES)) on visceral organ weights (g), fat depots (g) and ileum villi height (μm) of lambs at slaughter (27 kg)

	ADL	RES	RSD	P-value
Blood (g)	1221	1140	137.8	0.165
Heart (g)	155	179	28.2	0.043
Respiratory tract; pharynx, trachea, lungs (g)	502	502	51.9	0.988
Liver (g)	581	570	83.0	0.769
Spleen (g)	106	115	25.5	0.392
Rumen (g)	658	665	87.1	0.834
Total intestine (g)	1132	1109	127.6	0.543
Small intestine (% of total intestine)	69.4	65.1	4.41	0.040
Large intestine (% of total intestine)	30.6	34.9	4.41	0.040
Fat depots				
Omental (g)	101	129	92.2	0.055
Mesenteric (g)	205	161	27.2	0.017
Perirenal (g)	84	141	44.5	0.006
Liver fat (g/kg DM)	6.48	7.73	1.04	0.013
Ileum villi height (μm)	487	466	29.7	0.049

DM = dry matter; RSD = residual standard deviation.

with ADL lambs, whereas an opposite effect was observed for mesenteric fat.

Liver proteomic profile

The proteomic profile of the liver identified 26 spots/proteins with significant differences ($P < 0.05$) between both groups (Figure 2 and Table 4). In total, 18 of these proteins were down-regulated in the liver of RES lambs and most were involved in antioxidant defence (e.g. superoxide dismutase

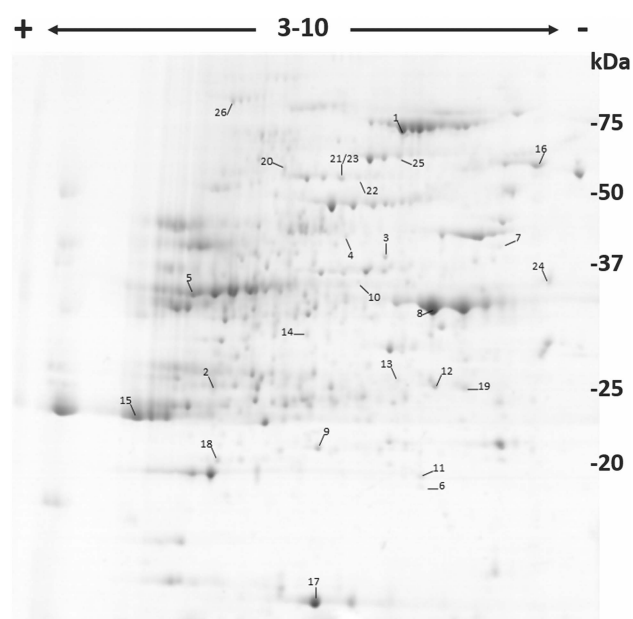


Figure 2 Representative colloidal Coomassie Blue stained 2D-E gel of a liver from early fed restricted lambs. A total of 450 μg of protein was loaded, and 2D-E was performed using a pH range of 3 to 10 in the first dimension, and SDS-PAGE in the second dimension. Marked spot numbers refer to numbers in Table 4.

[Cu–Zn] isoform X2, superoxide dismutase [Mn], mitochondrial and nmrA-like family domain-containing protein 1) and detoxication pathways (e.g. α/β hydrolase domain-containing protein 14B, microsomal glutathione-S-transferase, dihydrodiol dehydrogenase 3 and indolethylamine *N*-methyltransferase-like isoform X2), protein synthesis (e.g. endoplasmic reticulum resident protein 29 precursor and guanidinoacetate *N*-methyltransferase) and glucose (e.g. retinol-binding protein 4 and galactokinase) or fatty acid metabolism (e.g. enoyl-CoA hydratase, mitochondrial). The spots increased in the liver of the RES lambs were primarily related to protein catabolic pathways (e.g. dihydrolipoyl dehydrogenase and selenium-binding protein), protein folding (e.g. protein disulfide-isomerase A3 precursor) or the tricarboxylic acid cycle (e.g. aconitase hydratase, mitochondrial). Spots 7 (actin, cytoplasmic 1) and 24 (lysozyme C) were not identified as *Ovis aries* proteins. The last spot (8) showed no correspondence with any known identified protein (protein score < 93, $P > 0.05$).

Discussion

The present study was designed to quantify the effect of early feed restriction on feed efficiency during the fattening period of Merino lambs and to elucidate the mechanisms responsible for the long-term effects promoted by such restriction. This is relevant as milk intake can be reduced during the suckling period in farm conditions due to unhealthy status of the lambs, reduction of milk production of the dam or pathologies in the udder, thus lowering profitability during post-weaning phases.

As expected, RES animals grew more slowly during the suckling period as a consequence of feed restriction.

Table 4 List of spots/proteins identified by MALDI-TOF/TOF tandem MS analysis on the lamb liver 2D-E gel

Spot ¹	FC ²	Protein name ³	Accession number ⁴	Theor. MW	Exp. MW	Theor. pI	Exp. pI
Antioxidant defences							
14	-1.71	nmrA-like family domain-containing protein 1	XP_004020795.1	33 298	30 390	6.03	6.25
17	-1.57	Superoxide dismutase [Cu-Zn] isoform X2	XP_011990244.1	15 856	12 997	6.14	6.19
18	-1.56	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	NP_001267632.1	24 736	20 430	8.89	6.95
Detoxication pathways							
9	-1.89	α/β hydrolase domain-containing protein 14B	XP_004018465.1	22 583	21 221	6.29	6.17
15	-1.69	Microsomal glutathione-S-transferase A2	XP_011956243.1	25 488	23 416	8.86	7.57
5	-2.28	Dihydrodiol dehydrogenase 3	XP_004014369.1	36 994	34 472	8.12	7.14
19	-1.52	Indolethylamine N-methyltransferase-like isoform X2	XP_011967604.1	31 777	25 615	6.63	5.05
10	-1.28	Dihydrodiol dehydrogenase 3	XP_004014369.1	36 994	41 351	8.12	4.79
Protein metabolism							
13	-1.71	Endoplasmic reticulum resident protein 29 precursor	NP_001119826.1	28 985	26 287	5.63	5.56
12	-1.75	Guanidinoacetate N-methyltransferase	XP_011971527.1	26 866	25 793	5.46	5.27
1	-3.27	Serum albumin precursor	NP_001009376.1	71 139	69 364	5.80	5.52
16	-1.67	Protein disulfide-isomerase isoform X1	XP_004013116.2	67 358	59 136	5.25	4.51
25	∞	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	NP_001156517.1	57 379	62 517	6.23	5.46
22	2.57	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	NP_001156517.1	57 379	56 209	6.23	5.86
21	2.04	Selenium-binding protein 1 isoform X1	XP_012025411.1	53 053	55 938	6.32	5.99
23	3.27	Selenium-binding protein 1 isoform X2	XP_012025412.1	51 148	56 618	6.20	5.72
20	1.99	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	XP_004007902.1	54 705	58 144	7.59	6.43
Energy metabolism							
2	-2.98	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial isoform X2	XP_011963820.1	31 564	25 837	8.76	6.98
6	-2.16	Retinol-binding protein 4 isoform X2	XP_011992224.1	23 351	18 773	5.46	5.38
11	-1.75	Retinol-binding protein 4 isoform X2	XP_011992224.1	23 351	19 399	5.46	5.38
3	-2.78	Galactokinase isoform X1	XP_011965132.1	42 622	39 495	5.77	5.65
4	-2.68	Adenosine kinase isoform X2	XP_004021534.1	38 870	43 295	5.97	5.95
26	∞	Aconitate hydratase, mitochondrial isoform X1	XP_012031556.1	95 955	78 654	6.78	6.82

FC = fold change; MW = molecular weight (Da); Theor. = theoretical; Exp. = experimental; pI = isoelectric point; RES = early fed restricted lambs; ADL = *ad libitum*.

¹Spots number labelled in Figure 2. Spot 8 showed no correspondence with any identified protein (protein score < 93, $P > 0.05$), whereas spot 7 (actin, cytoplasmic 1) and 24 (lysozyme C) were neither included in Table 4 because they were not identified as *Ovis aries* proteins.

²positive value if RES/ADL > 1.5; negative value if ADL/RES > 1.5; ∞ if ADL = 0.

³Identified by results of MALDI-TOF/TOF tandem MS analysis.

⁴From MASCOT database search (MatrixScience).

Likewise, and in accordance with previous studies (Davies and Owen, 1967; Bhatt *et al.*, 2009; Galvani *et al.*, 2014), RES lambs also showed lower ADG from weaning to slaughter than ADL lambs, even though DMI was identical for both groups (35 g/kg LBW per day). Consequently, the RES lambs showed reduced feed efficiency during the fattening period.

The forestomachs of ruminants host a great diversity of micro-organisms that break down and ferment most feed ingested by the animal; as a consequence, the ruminal microbiome diversity and functional capacity underpin digestive efficiency in the rumen (Weimer, 2015). However, in the present study, there were no differences between treatments in the rumen microbiota (T-RFLP (not shown) or qPCR) or in the rumen fermentation end-products. In ruminants, the gastrointestinal tract is sterile at birth but is rapidly colonised by micro-organisms from adult animals and the surrounding environment within the 1st days of life (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2015). However, in the present study, the animals were ewe-reared, followed the same progressive weaning process, and were fed the same diet at a similar

level of intake during the fattening period. Therefore, the effect of factors such as the introduction of solid feed or level of forage intake before weaning, which might affect rumen microbial population (Weimer, 2015), was avoided. This would explain the lack of differences between groups in both ruminal microbiota and ruminal fermentation parameters.

Moreover, there is evidence that feed restriction and starvation induces changes in the morphology of the mucosa of the small intestine, and more precisely villus height and crypt depth, thus affecting absorption of nutrients in the gastrointestinal tract (Chappell *et al.*, 2003). In the present study, average villus height was shorter in the ileal epithelium of RES lambs, suggesting a reduced cellularity in the epithelia of this group (Chappell *et al.*, 2003). These results differ from those observed by other authors in lagomorphs, where an increase in size of the small intestine was observed when they were subjected to feed restriction, likely due to increased absorption of nutrients as an adaptation mechanism (Makovicky *et al.*, 2014). Nevertheless, in our study the animals were slaughtered at the end of the fattening period, so differences in the weight of the intestine caused by early

feed restriction during the suckling phase might have been modified throughout the fattening period, when DMI was similar for both groups. In any case, the smaller weight ratio of the small to large intestine, which is likely also related to the reduced mesenteric fat depot observed in the RES compared with the ADL lambs, together with the shorter villi height in the RES lambs, might have reduced the absorption of nutrients during the fattening period, thus contributing to the observed differences in ADG and feed efficiency of the lambs. However, lack of significant differences in total apparent digestibility of the diet led us to think about changes in feed efficiency promoted by the amount/proportion of nutrients digested in each part of the tract, which might have been modified according to the different proportions represented by the small/large intestine in the ADL and RES groups.

The greater weight of the heart observed in the RES lambs, which has also been described by Greenwood *et al.* (2004) following postnatal feed restriction in sheep, could have been caused by an impairment of mitochondrial metabolism promoted by the lack of nutrients during early life (Wai *et al.*, 2015), as will be explained below for liver proteomic profiling. In fact, any deficiency in energy production might be critical for one of the highest energy demanding tissues, the cardiac muscle, so myocyte hypertrophy may be promoted as an adaptive response to increase myocyte contractile strengthening (Harvey and Leinwand, 2011; Meyers *et al.*, 2013).

Liver characteristics may also allow for better understanding of some of the mechanisms involved in the long-term effects of early feed restriction. The weight of this organ was similar for both groups, but important differences in the proteomic profile of the liver, which would be indicative of different metabolic uses of nutrients, were observed following early feed restriction. For example, fatty acid metabolism is one of the principal sources of energy for skeletal and cardiac muscle and is active in the liver (Quijano *et al.*, 2016). Short-, medium- and long-chain fatty acids are degraded to acetyl-CoA by mitochondrial β -oxidation, which allows acetyl-CoA to enter the tricarboxylic acid cycle. Energy released during this process is used for ATP generation by oxidative phosphorylation in the inner mitochondrial membrane. However, RES lambs showed more accumulation of fat in several depots including the liver (Table 2) and intramuscular fat (Santos *et al.*, 2018), which might be related to inhibition of β -oxidation (e.g. down accumulation of enoyl-CoA hydratase, mitochondrial isoform X2, in RES lambs), accumulation of upstream metabolites, and hence impaired fatty acid catabolism for energy production (Alexandre *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2017). In agreement with this hypothesis, liver fat accretion (as occurred in the RES lambs) has also been related to severe impairment of mitochondrial lipid metabolism mainly promoted by a deficiency in adenosine kinase (Boison *et al.*, 2002), an enzyme which was also reduced in the liver of the RES lambs in this study.

The lower levels of those proteins involved in antioxidant defences observed in the liver of RES lambs are also

consistent with less active mitochondrial activity and reduced fatty acid catabolism for ATP production, which is tightly linked to the production of reactive oxygen species such as O_2^- and H_2O_2 (Quijano *et al.*, 2016). Additionally, the lower levels of serum albumin precursor (a carrier protein for a wide range of endogenous molecules including hormones, fatty acids, metabolites and Zn required by SOD2) in the RES lambs might have contributed to the decrease in lipid mobilisation and transport, leading to fat deposition. Furthermore, the increased levels of aconitate hydratase, mitochondrial isoform X1 in the livers of RES lambs also support the negative long-term effects of early feed restriction in the mitochondria. In fact, this enzyme is a moonlighting protein which binds directly to mitochondrial DNA under non-optimal conditions, contributing to its maintenance (Chen *et al.*, 2005). Accordingly, increased levels of this protein (which is also involved in the tricarboxylic acid cycle) in the livers of RES lambs do not contradict the mitochondrial dysfunction mentioned above. In fact, our results are in agreement with Vincent *et al.* (2015), who detected increments of this protein in the muscles of the least efficient pigs. It must be stated, however, that our results differ from those of Grubbs *et al.* (2013), who described a decrease of aconitase in the muscles of the least efficient pigs. The apparent contradiction described by these studies might be explained by the fact that Grubbs *et al.* (2013) studied only the intrinsic mitochondrial composition whose proteome might differ from the one obtained from muscle.

The up-regulation in RES lambs of mitochondrial dihydrolipoyl dehydrogenase, an enzyme involved in the pyruvate dehydrogenase complex, also seemed to contradict the mitochondrial dysfunction previously mentioned. In fact, again, our results differ from those described by Grubbs *et al.* (2013), who showed a lower abundance of the dihydrolipoyl dehydrogenase in isolated mitochondria from the red portion of the semitendinosus muscle of the least efficient pigs. However, this protein also functions as a serine protease in non-optimal conditions (Babady *et al.*, 2007). Therefore, this protein might indicate the existence of long-term effects promoted by early feed restriction, with a shift towards increased protein catabolism in restricted lambs. In agreement with this idea, the selenium-binding protein, which may play a selenium-dependent role in ubiquitination/deubiquitination-mediated protein degradation, was also increased in the liver of RES lambs, likely to use amino acids as an energy source. This situation, together with reduced fatty acid catabolism, might help explain the reduced performance (in terms of decreased ADG) observed in the RES lambs (Santos *et al.*, 2018). Long-term effects of early feed restriction were also observed in genes involved in glucose metabolism (e.g. galactokinase isoform X1 and retinol-binding protein 4 isoform X2). Furthermore, several proteins implicated in protein folding (e.g. protein disulfide-isomerases and endoplasmic reticulum protein 29) were differentially accumulated in both experimental groups. Finally, detoxification and excretion of xenobiotics and/or metabolites might have been affected by early feed

restriction of lambs, as suggested by the down-regulation of several proteins (e.g. $\alpha\beta$ hydrolase domain-containing protein 14B, microsomal glutathione-S-transferase, partial, dihydrodiol dehydrogenase 3 and indolethylamine N-methyltransferase-like isoform X2) likely involved in these functions. In contrast with our results, glutathione-S-transferase was up-regulated in the liver transcriptome of the least efficient bulls (Chen *et al.*, 2011). However, unlike our study where early feed restriction was carried out, the reasons for different feed efficiency traits were not ascertained by Chen *et al.* (2011), which could explain the differences observed in the two studies.

Conclusions

According to the results of the present study, early feed restriction impairs feed efficiency during the subsequent fattening phase of lambs. This effect might be largely related to differences in gastrointestinal morphology or metabolic use of nutrients, which may affect β -oxidation of fatty acids, leading to increased fat accretion in several depots. These effects, together with the increased catabolism of proteins indicated by the proteomic profile of the liver, suggest differences in the energy sources used for maintenance and growth, resulting in inferior post-weaning feed efficiency in early feed restricted lambs.

Acknowledgements

This work was funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO, AGL2014-54124R). Alba Santos gratefully acknowledges receipt of a pre-doctoral grant from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (MECD, FPU15/01630). The authors also thank Julio Benavides for providing histological sections of intestinal samples.

Declaration of interest

None.

Ethics statement

All handling practices followed the recommendations of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes and the IGM-CSIC Animal Experimentation Committee (protocol number 2015-04).

Software and data repository resources

None.

References

Alexandre PA, Kogelman LJA, Santana MHA, Passarelli D, Pulz LH, Fantinato-Neto P, Silva PL, Leme PR, Strefezzi RF, Coutinho LL, Ferraz JBS, Eler JP, Kadarmideen HJ and Fukumasu H 2015. Liver transcriptomic networks reveal main biological processes associated with feed efficiency in beef cattle. *BMC Genomics* 16, 1073.

Andrés S, Bodas R, Tejado ML, Giráldez FJ, Valdés C and López S 2016. Effects of the inclusion of flaxseed and quercetin on the diet of fattening lambs on ruminal microbiota, in vitro fermentation and biohydrogenation of fatty acids. *Journal of Agricultural Science* 154, 542–552.

AOAC 2003. Official methods of analysis, 17th edition. Association of Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.

Babady NE, Pang YP, Elpeleg O and Isaya G 2007. Cryptic proteolytic activity of dihydroliipoamide dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 6158–6163.

Bell AW and Greenwood PL 2016. Prenatal origin of postnatal variation in growth, development and productivity in ruminants. *Animal Production Science* 56, 1217–1232.

Bhatt RS, Tripathi MK, Verna DL and Karim SA 2009. Effect of different feeding regimes on pre-weaning growth, rumen fermentation and its influence on post-weaning performance of lambs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 93, 568–573.

Boison D, Scheurer L, Zumsteg V, Rüllicke T, Litynski P, Fowler B, Brandner S and Mohler H 2002. Neonatal hepatic steatosis by disruption of the adenosine kinase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 6985–6990.

Carro MD and Miller EL 1999. Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an in vitro semi-continuous culture system (RUSITEC). *British Journal of Nutrition* 82, 149–157.

Chappell VL, Thompson MD, Jeschke MG, Chung DH, Thompson JC and Wolf SE 2003. Effects of incremental starvation on gut mucosa. *Digestive Diseases and Sciences* 48, 765–769.

Chen XJ, Wang XW, Kaufman BA and Butow RA 2005. Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science* 307, 714–717.

Chen Y, Gondro C, Quinn K, Herd RM, Parnell PF and Vanselow B 2011. Global gene expression profiling reveals genes expressed differentially in cattle with high and low residual feed intake. *Animal Genetics* 42, 475–490.

Davies DAR and Owen JB 1967. The intensive rearing of lambs 1. Some factors affecting performance in the liquid feeding period. *Animal Science* 9, 501–508.

Denman SE, Tomkins NW and McSweeney CS 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the anti-methanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology* 62, 313–322.

de Paula EFE, de Souza DF, Monteiro ALG, Santana MHA, Gilaverte S, Rossi P Jr and Dittrich RL 2013. Residual feed intake and hematological and metabolic blood profiles of Ile de France lambs. *Revista Brasileira de Zootecnia – Brazilian Journal of Animal Science* 42, 806–812.

Fu L, Xu Y, Hou Y, Qi X, Zhou L, Liu H, Luan Y, Jing L, Miao Y, Zhao S, Liu H and Li X 2017. Proteomic analysis indicates that mitochondrial energy metabolism in skeletal muscle tissue is negatively correlated with feed efficiency in pigs. *Scientific Reports* 7, 45291.

Galvani DB, Pires CC, Hübner CH, Carbalho S and Wommer TP 2014. Growth performance and carcass traits of early-weaned lambs as affected by the nutritional regimen of lactating ewes. *Small Ruminant Research* 120, 1–5.

Gotoh T 2015. Potential of the application of epigenetics in animal production. *Animal Production Science* 55, 145–158.

Greenwood PL, Hunt AS and Bell AW 2004. Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: IV. Organ growth. *Journal of Animal Science* 82, 422–428.

Grubbs JK, Fritchen AN, Huff-Lonergan E, Gabler NK and Lonergan SM 2013. Selection for residual feed intake alters the mitochondria protein profile in pigs. *Journal of Proteomics* 80, 334–345.

Harvey PA and Leinwand LA 2011. The cell biology of disease cellular mechanisms of cardiomyopathy. *The Journal of Cell Biology* 194, 355–365.

Makovicky P, Tumova E, Volek Z, Makovicky P and Vodicka P 2014. Histological aspects of the small intestine under variable feed restriction: the effects of short and intense restriction on a growing rabbit model. *Experimental and Therapeutic Medicine* 8, 1623–1627.

Meyer AM, Caton JS, Hess BW, Ford SP and Reynolds LP 2012. Epigenetics and effects on the neonate that may impact feed efficiency. In *Feed efficiency in the beef industry* (ed. RA Hill), pp. 199–223. John Wiley & Sons, Inc, Ames, IA, USA.

Meyers DE, Basha HI and Koenig MK 2013. Mitochondrial cardiomyopathy, pathophysiology, diagnosis, and management. *Texas Heart Institute Journal* 40, 385–394.

- Ouwkerk D, Klieve AV and Forster RJ 2002. Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay. *Journal of Applied Microbiology* 92, 753–758.
- Quijano C, Trujillo M, Castro L and Trostchansky A 2016. Interplay between oxidant species and energy metabolism. *Redox Biology* 8, 28–42.
- Rui L 2014. Energy Metabolism in the Liver. *Comprehensive. Physiology* 4, 177–197.
- Santos A, Giráldez FJ, Groenen MAM, Madsen O, Frutos J, Valdés C and Andrés S 2017. Modifications in liver transcriptomic profile of fattening lambs by early suckled milk intake level. In *The 68th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP)*, Tallinn, Estonia. (Theater presentation 43: 390).
- Santos A, Giráldez FJ, Mateo J, Frutos J and Andrés S 2018. Programming Merino lambs by early feed restriction reduces growth rates and increases fat accretion during the fattening period with no effect on meat quality traits. *Meat Science* 135, 20–26.
- Stevenson DM and Weimer PJ 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 165–174.
- Tizioto PC, Coutinho LL, Decker JE, Schnabel RD, Rosa KO, Oliveira PSN, Souza MM, Mourão GB, Tullio RR, Chaves AS, Lanna DPD, Zerlotini-Neto A, Mudadu MA, Taylor JF and Regitano LCA 2015. Global liver gene expression differences in Nelore steers with divergent residual feed intake phenotypes. *BMC Genomics* 16, 242.
- Van Keulen JV and Young BA 1977. Evaluation of acid insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *Journal of Animal Science* 44, 282–287.
- Vincent A, Louveau I, Gondret F, Tréfeu C, Gilbert H and Lefaucheur L 2015. Divergent selection for residual feed intake affects the transcriptomic and proteomic profiles of pig skeletal muscle. *Journal of Animal Science* 93, 2745–2758.
- Wai T, García-Prieto J, Baker MJ, Merkwirth C, Benit P, Rustin P, Rupérez FJ, Barbas C, Ibañez B and Langer T 2015. Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. *Science* 350, 6265.
- Weimer PJ. 2015. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentation. *Frontiers in Microbiology* 6, 296.
- Yáñez-Ruiz DR, Abecia L and Newbold CJ 2015. Manipulating microbioma and fermentation through interventions during early life: a review. *Frontiers in Microbiology* 6, 1133.

Capítulo II

Liver transcriptomic and plasma metabolomic profiles of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period

Publicado en: Journal of Animal Science

Liver transcriptomic and plasma metabolomic profiles of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period¹

Alba Santos,[†] Francisco Javier Giráldez,[†] Erminio Trevisi,[‡] Luigi Lucini,^{||} Javier Frutos,[†]
and Sonia Andrés^{†,2}

[†]Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), Finca Marzanas, Grulleros, León, Spain;

[‡]Institute of Zootechnics, Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Emilia Parmense, Piacenza, Italy; ^{||}Institute of Environmental and Agricultural Chemistry, Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Emilia Parmense, Piacenza, Italy

ABSTRACT: The increasing world population is driving demand for improved efficiency of feed resources of livestock. However, the molecular mechanisms behind various feed efficiency traits and their regulation by nutrition remain poorly understood. Here, we aimed to identify differentially expressed (DE) genes in the liver tissues of fattening Merino lambs and differences in metabolites accumulated in plasma to identify modified metabolic pathways as a consequence of milk restriction during the suckling period. Twenty-four male Merino lambs (4.81 ± 0.256 kg) were divided into 2 groups ($n = 12$ per dietary treatment). The first group (ad libitum, **ADL**) was kept permanently with the dams, whereas the other group (restricted, **RES**) was milk restricted. When they reached 15 kg of live body weight (**LBW**), all the animals were offered the same complete pelleted diet at the same level (35 g DM/kg LBW per day) to ensure no differences in dry matter intake. All the lambs were harvested when they reached 27 kg of LBW. For transcriptomic analysis, 4 liver samples from each group (8 samples in total) were selected for RNA sequencing (RNA-seq), and plasma samples from all animals (24 samples in total) were used to perform a nontargeted

metabolomic analysis on a hybrid quadrupole-time-of-flight mass spectrometer coupled to an ultra-high performance liquid chromatographic system (UHPLC/QTOF-MS). Thirty-eight DE annotated genes were identified by RNA-seq, with 23 DE genes being down-regulated and 15 up-regulated in the liver of RES lambs relative to the ADL group ($P < 0.10$). Also, the metabolomic assay identified 38 differentially accumulated compounds ($P < 0.10$). In general, those genes and pathways involved in protein synthesis or protease inhibitors were down-regulated in the RES group, whereas those related to proteolytic degradation were up-regulated, thus suggesting a higher catabolism of proteins in these lambs. RES lambs showed over-expression of xenobiotic metabolism pathways, whereas those genes related to β -oxidation of fatty acids were down-regulated. According to the data obtained, early feed restriction during the suckling period of Merino lambs promoted long-term effects on both the hepatic transcriptomic profile and plasma metabolic profile, which might have modified fatty acids metabolism, catabolism of proteins, and detoxification of xenobiotics, thus reducing feed efficiency during the fattening period.

Key words: feed efficiency, feed restriction, lamb, metabolomics, transcriptomics

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of American Society of Animal Science. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

J. Anim. Sci. 2018.96:1495–1507
doi: 10.1093/jas/sky029

¹This work was funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry, and Competitiveness (MINECO, AGL2014-54124R). A.S. gratefully acknowledges receipt of a predoctoral grant from the Spanish Ministry of Education, Culture, and Sport (MECD, FPU15/01630). We would like to thank Martien Groening and Ole Madsen (Wageningen

University and Research, Animal Breeding, and Genomics) for their assistance with the English revision.

²Corresponding author: sonia.andres@eae.csic.es

Received July 14, 2017.

Accepted February 15, 2018.

INTRODUCTION

The search for solutions towards a more efficient use of resources is being promoted in the context of an increasing world population. Concerning the livestock sector, environmental factors (such as prenatal nutrition) have been postulated as important under the term “early nutritional programming,” which may affect metabolism, growth, and development, and thereby the feed efficiency and health of the offspring (Roseboom et al., 2011; Ruchat et al., 2014). Although studies addressing nutrition during the neonatal period of lambs are scarce, some have demonstrated early nutritional programming during this phase (Davies and Owen, 1967; Greenwood et al., 2004; Galvani et al., 2014). Moreover, several experiments have described the molecular mechanisms promoted by early feed restriction in children (Ruchat et al., 2014), cattle (Alexandre et al., 2015), and pigs (Vincent et al., 2015), whereas this has not been described for fattening lambs. Consequently, a deeper knowledge in this field is needed in order to design strategies to achieve greater efficiency when fattening lambs, because this will determine the overall profitability and sustainability of this production system.

Modern molecular and -omic tools (i.e., epigenomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics) are further increasing our understanding of the cascade from genes to phenotypes (Tizioto et al., 2015). Therefore, such studies can be used as an initial step to investigate the molecular mechanisms triggered by early feed restriction of lambs. Here, we aim to describe the long-term effects on metabolic pathways promoted by early feed restriction of Merino lambs, attempting to identify both differentially expressed (DE) genes in the liver and differentially accumulated metabolites in the plasma, and reasoning that this approach might highlight potential strategies to improve feed efficiency during the fattening period through either selection or improved management practices.

MATERIALS AND METHODS

Care and Use of Animals

All handling practices involving animals followed the recommendations of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council on the Protection of Animals used for Scientific Purposes and the IGM-CSIC Animal Experimentation Committee (protocol number 2015-04).

Animal Diets and Sampling

Twenty-four male Merino lambs, penned individually with their corresponding ewe during the suckling period, were used in this experiment. The lambs were stratified by live body weight (LBW) at birth (4.81 ± 0.256 kg) and then assigned randomly to one of the two experimental treatments ($n = 12$ per dietary treatment) during the suckling period. The first group of lambs (ad libitum [ADL]) was kept permanently with the dams, whereas the other group (restricted [RES]) was separated within 9 to 18 h. Dams of the RES group were injected with oxytocin to remove alveolar milk and then milked at 17 h (an hour before the reintroduction of lambs). The milk yield of all the ewes (RES and ADL groups) was recorded on weeks 3, 5, and 7, according to the McCance (1959) method, using oxytocin (intravenous injection of oxytocin before each milking, Oxitón, Laboratorios Ovejero, España) and a milking machine. All lambs were weighed twice per week throughout the suckling period and vaccinated against enterotoxemia and Pasteurella (Heptavac P Plus, MSD Animal Health) when they were 4-weeks-old.

When each lamb reached 13.5 kg of LBW, it was weaned progressively (free access to a complete pelleted diet [CPD] and alfalfa, whereas it was allowed only 2 h with the dam) until it weighed 15 kg. Once the target weaning LBW was reached (15 kg), each lamb was penned individually and offered the same CPD at the same level (35 g/kg LBW each day) to ensure no variations in DM intake during the fattening phase. Fresh drinking water was always available. All of the lambs received the CPD once per day at 09:00 h; the daily amount of feed offered was adjusted twice per week based on LBW. Leftovers (if any) were collected daily, pooled in weekly composites for each animal, and analyzed for DM content. Ingredients and chemical composition of the CPD administered are summarized in Table 1.

Blood samples were collected from all of the animals during the fattening period by jugular venepuncture into 10-mL vacutainer tubes containing lithium-heparin, placed in iced water, and then centrifuged at $3,520 \times g$ for 16 min at 5 °C. The obtained plasma was stored at -80 °C until metabolomic profiling. Finally, all the animals were harvested with a target body weight of 27 kg. A piece of liver was excised immediately, stabilized with RNAlater (Ambion, Inc., Austin, TX, USA) overnight at 4 °C, and then stored at -80 °C until transcriptomics analysis (RNA-seq).

Table 1. Ingredients and chemical composition (g/kg DM unless otherwise stated) of the complete pelleted diet administered during the fattening period of Merino lambs

Ingredients, g/kg	
Barley	433
Corn	150
Soybean meal 44	237
Barley straw	150
Vitamin-mineral premix	30
Chemical composition, g/kg DM	
DM, g/kg	900
NDF	227
ADF	121
CP	174
Fat	30
Ash	68
Metabolizable energy, kcal/kg	2464

Transcriptomics Analysis of Liver Samples Using RNA-seq

RNA extraction. A comparative liver transcriptome analysis was carried out using next-generation sequencing (RNA-seq). The minimum number of liver samples to cover the complete range of values of average daily gain (feed efficiency) in each group was selected for RNA extraction (4 animals per group and 8 samples in total), which was performed using RNeasy Mini kit and RNase-Free DNase Set kit (Qiagen, Hilden, Germany). Concentration and quality of the extracted RNA were first verified by NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) and further evaluated with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) after separation using an RNA 6000 Nano Kit. All of the samples had an RNA integrity number (RIN) larger than 8 (8.5 ± 0.04).

Library preparation, RNA sequencing, and data processing. Library preparation for RNA-seq (transcriptome sequencing) was performed on an Illumina HiSeq 2500 sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA) to obtain readings of 100 base pairs (bp) in length from each sample; cDNA libraries were obtained according to the manufacturer's instructions. The quality of the libraries was analyzed in an Agilent 2100 Bioanalyzer and quantified by real-time PCR in a LightCycler 480 (Roche). Finally, libraries were pooled to perform paired-end multiplex sequencing (2×100 bp) on the Illumina HiSeq 2500 sequencer. The quality of the obtained data was evaluated with the FastQC program to identify possible artifacts in the sequencing. The readings generated were expurgated

through the BBDuk program. The sequence and annotation of the most recent ovine genome assembly were obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (accession number GCF_000298735.2, assembly Oar_v4.0). The expurgated readings were mapped on the sequence of this genome with the BMAP program (part of the BBTools package).

Annotation, standardization, and statistical analysis of differentially expressed genes. The identification of new and annotated transcripts that presented differential transcription between the experimental groups was made by mapping with HISAT, the assembly with StringTie, and the statistical analysis of Ballgown, following the workflow of [Perteira et al. \(2016\)](#). A differential expression analysis was performed with the Bioconductor package DESeq2 (version 1.12.4). Statistical analyses of differentially expressed genes were performed in R (version 3.3.1). Also, the Transcripts Per Kilobase Million (TPM) values were calculated according to [Wagner et al. \(2012; PMID 22872506\)](#) using DESeq2-normalized read counts. The data were deposited in the Gene Expression Omnibus database ([GEO] accession number GSE107064). Genes were considered to be differentially expressed if their *P*-value, adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method (false discovery rate [FDR]), was less than 0.1 ([Benjamini and Hochberg, 1995](#)).

Functional enrichment analysis. Gene ontology (GO) term enrichment analysis was performed through the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID), version 6.8. The Functional Annotation Tool of DAVID was used to determine the most relevant GO terms within the list of DE genes. Moreover, Kyoto Encyclopedia Genes and Genomes (KEGG) pathways analysis was carried out with the *kegg* function of the edgeR package. The results of both procedures allowed us to interpret the DE gene lists.

Metabolomic Analysis of Blood Plasma Samples

Extraction and ultra-high performance liquid chromatographic system (UHPLC/QTOF-MS) analysis. Plasma samples were analyzed in duplicate to obtain the metabolomic profile. Aliquots of each sample (150 μ L) were diluted twice in 10 volumes of acetonitrile:methanol:trichloroacetic acid mixture (50:47:3 vol/vol, LCMS grade from VWR, Milan, Italy), vortex-mixed, and then left at -18 °C overnight. Extracts were then centrifuged ($8,000 \times g$) at 4 °C and the supernatant filtered through a 0.2- μ m cellulose syringe filter. The metabolomic

analysis was then carried out on a hybrid quadrupole-time-of-flight mass spectrometer coupled to an UHPLC/QTOF-MS. An Agilent 1290 liquid chromatography system was used, equipped with binary pump and a Dual Electrospray Jet Stream ionization system, and then coupled to an Agilent G6550 mass spectrometer detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The instrument was run in positive mode and acquired MS-only spectra in the range of 100 to 1,600 m/z. Chromatographic separation was achieved using a Knauer BlueOrchid C18 column (100 × 2 mm i.d., 1.8 μm). The LC mobile phase was a mixture of water (proteomic grade from VWR) and methanol (LCMS grade from VWR); formic acid (0.1%, vol/vol) and ammonium formate (5 mM) (both from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added to both phases. UHPLC/QTOF-MS chromatographic gradient and source parameters were taken from previous experiments (Lucini et al., 2015). Briefly, the gradient started with 5% methanol and was increased to 90% methanol within 34 min, and the solvents temperature was set to 35 °C. The flow rate was 220 μL/min, and the injection volume was 3.5 μL.

QTOF raw data were processed by the Profinder B.06 software (from Agilent Technologies) using the naïve find-by-molecular-feature algorithm (isotopic model: small compounds after chromatography, no halogens). Molecular features were recursively identified after deconvolution followed by mass and retention time alignment. Compounds that were not present in 80% of the replicates within at least 1 treatment were discarded. Compound identification was based on both accurate mass and isotope pattern (accurate spacing and isotopes ratio) and performed using the database Metlin (from Agilent Technologies). The compounds passing alignment and filtering were finally exported in Mass Profiler Professional B.12.05 (Agilent technologies) for statistics.

Statistical analysis. Compounds were log₂ normalized, and their abundances normalized at the 75th percentile and baselined against the median of control (ADL). Unsupervised cluster analysis (hierarchical cluster algorithm; Euclidean similarity measure) and partial least squares discriminant analysis ([PLS-DA], N-fold validation with $n = 4$) were performed on the baseline dataset. Concerning PLS-DA, the compounds' weight within the latent vectors in the class prediction model was plotted (loading plot), and the most relevant ones exported and recorded. ANOVA analysis ($P < 0.1$, Bonferroni multiple testing corrections) and fold-change analysis (cut-off = 3) were then combined into volcano plots to identify differential metabolites.

RESULTS AND DISCUSSION

Understanding the causes of low feed efficiency might be the first step towards selecting efficient animals or finding solutions to express their utmost potential, thus helping to reduce farm feeding costs. Therefore, the aim of the present study was to establish the molecular mechanisms behind the long-term effects on feed efficiency traits of fattening Merino lambs promoted by early feed restriction during the suckling period.

Milk production was similar for all the ewes (ADL and RES groups) under experimental conditions (week 3, 110 ± 8.47 g/h; week 5, 102 ± 6.52 g/h; week 8, 97 ± 6.97 g/h). Hence, as expected, the lambs separated from the dams during 9 h each day (RES) grew more slowly during the suckling period (Supplementary Table 1) probably because after being milked, milk production of the RES ewes was insufficient to satisfy the demand of the RES lambs. However, once the weaning weight was reached, RES lambs also showed lower average daily gain (165 vs. 202 g/d for RES and ADL lambs, respectively; $P < 0.01$) even though during this period dry matter intake was fixed for both groups (35 g/kg LBW each day) to avoid confounding effects with early feed restriction. Thus, RES animals took more days (62 vs. 74 days for the ADL and RES groups, respectively; $P < 0.001$) to reach the intended LBW (27 kg LBW) and, consequently, the total DM intake during the fattening period was increased (39.3 vs. 47.5 kg; $P < 0.001$; Supplementary Table 1). Therefore, as explained before (Santos et al., 2018a,b), RES lambs showed reduced feed efficiency traits, this effect not being associated with age or intake differences during the fattening period. This is extremely important because according to our results, early feed restriction due to health problems of the lambs, milk production of the dam, or pathologies in the udder may result in significant costs in the profitability of the farm during post-weaning phases.

Transcriptomic Profile

The liver is the major metabolic organ in the body and regulates a wide variety of metabolic processes (Ji et al., 2012; Zheng et al., 2016); therefore, global transcript profiling of the liver is a logical approach for identifying the long-term effects on feed efficiency traits promoted by early feed restriction during the suckling period of lambs. Differential gene expression analysis in the liver tissue of Merino lambs with different nutritional levels during the preweaned period identified 38 DE annotated genes. Positive values of log₂-fold change

(log₂FC) indicated that 15 genes were up-regulated in the RES relative to the ADL group, whereas negative log₂FC values denoted the down-regulation of 23 genes (Table 2).

With respect to fatty acid metabolism, several enzymes (e.g., *ACSM3* and *ACOT13*) involved in fatty acid activation before they can be carried into the mitochondria (where fatty acid oxidation

takes place) were down-regulated in the RES group. Together with the lower expression of genes involved in the oxidative phosphorylation and mitochondrial electron transport chain (e.g., *ND3*), this might indicate that β -oxidation of fatty acids (and hence ATP production through this pathway) was down-regulated in RES lambs, which, in accordance with those in the works of [Alexandre](#)

Table 2. Differential expression of genes in the livers of fattening lambs allowed ADL or RES milk intake during the suckling period

Gene ID and function	Description	TPM ^a mean	TPM ^a mean	log ₂ FC ^b	P-value	FDR ^c
		ADL	RES			
<i>LOC101110202</i>	Cytochrome P450 3A24-like	508	749	0.433	8.45E-08	0.0005
<i>CYP2C19</i>	Cytochrome P450 2C19	347	819	0.708	3.48E-05	0.0218
<i>CYP3A24</i>	Cytochrome P450 CYP3A24	1,150	1,956	0.548	6.48E-05	0.0304
<i>CDC37L1</i>	Cell division cycle 37 like 1	15	22	0.381	2.35E-06	0.0026
<i>APOH</i>	Apolipoprotein H	5,423	4,484	-0.359	9.67E-06	0.0091
<i>F2</i>	Coagulation factor II, thrombin	1,270	1,038	-0.366	1.00E-04	0.0433
<i>TF</i>	Serotransferrin	9,775	7,643	-0.420	1.75E-05	0.0123
<i>GUCY2C</i>	Guanylate cyclase 2C	5	12	0.619	4.30E-04	0.0893
<i>ACSM3</i>	Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3	755	604	-0.382	3.00E-04	0.0877
<i>ACOT13</i>	Acyl-CoA thioesterase 13	166	128	-0.419	4.20E-04	0.0893
<i>ACOX3</i>	Acyl-CoA oxidase 3, pristanoyl	44	28	-0.561	4.80E-04	0.0893
<i>FADS6</i>	Fatty acid desaturase 6	186	136	-0.459	5.20E-04	0.0893
<i>ND3</i>	NADH dehydrogenase subunit 3	1,751	1,057	-0.686	3.21E-07	0.0005
<i>APOM</i>	Apolipoprotein M	121	96	-0.392	2.30E-04	0.0843
<i>ABCA10</i>	ATP binding cassette subfamily A member 10	118	96	-0.364	6.50E-04	0.0972
<i>CST3</i>	Cystatin C	314	222	-0.515	5.22E-05	0.0280
<i>SERPINA11</i>	Serpin family A member 11	235	199	-0.318	4.70E-04	0.0893
<i>DNAJA1</i>	DnaJ heat shock protein family member A1	14	21	0.422	4.10E-04	0.0893
<i>LOC101105132</i>	DnaJ homolog subfamily A member 1	24	37	0.430	4.20E-04	0.0893
<i>LOC105605968^d</i>	DnaJ homolog subfamily A member 1	36	56	0.468	5.47E-05	0.0280
<i>LOC101101922^d</i>	DnaJ homolog subfamily A member 1	29	46	0.474	2.90E-04	0.0877
<i>LOC101102122^d</i>	60S acidic ribosomal protein P1	596	471	-0.420	3.84E-07	0.0005
<i>RPLP1</i>	Ribosomal protein lateral stalk subunit P1	871	692	-0.403	1.37E-05	0.0110
<i>RPL3</i>	Ribosomal protein L3	548	494	-0.245	2.90E-04	0.0877
<i>LOC101114033</i>	60S ribosomal protein L17	208	179	-0.297	6.50E-04	0.0972
<i>DPYS</i>	Dihydropyrimidinase	358	233	-0.541	4.20E-04	0.0893
<i>ACP5</i>	Acid phosphatase 5, tartrate resistant	82	56	-0.571	3.55E-07	0.0005
<i>RBMS2</i>	RNA binding motif single stranded interacting protein 2	8	6	-0.436	4.50E-04	0.0893
<i>SERINC2</i>	Serine incorporator 2	13	28	0.633	2.40E-04	0.0843
<i>GCAT</i>	Glycine C-acetyltransferase	190	139	-0.454	6.60E-04	0.0972
<i>NUFIP2</i>	NUFIP2, FMR1 interacting protein	16	25	0.454	2.40E-04	0.0843
<i>PLXNA2</i>	Plexin A2	4	2	-0.555	5.70E-04	0.0911
<i>LOC101106024</i>	Secreted and transmembrane protein 1A-like	47	92	0.592	3.30E-04	0.0893
<i>ELK4</i>	ELK4, ETS transcription factor	10	14	0.402	5.40E-04	0.0893
<i>EPS8</i>	Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	10	14	0.363	5.40E-04	0.0893
<i>C1H21orf33</i>	Chromosome 1 open reading frame, human C21orf33	161	126	-0.399	5.00E-04	0.0893
<i>LOC101121401^d</i>	Ferritin heavy chain	273	227	-0.344	4.80E-04	0.0893
<i>CCDC117</i>	Coiled-coil domain containing 117	16	22	0.344	5.30E-04	0.0893

^aTPM = Transcripts Per Kilobase Million.

^bFold change estimates are relative to ADL group, so positive values indicate greater expression in RES lambs.

^cFDR = false discovery rate.

^dNonexpressed pseudogenes.

et al. (2015), Tizioto et al. (2015), and Weber et al. (2016), might have promoted differences in feed efficiency. Also, two genes involved in the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids (e.g., *ACOX3* and *FADS6*) were down-regulated in the RES lambs. In fact, these circumstances might be related to the higher storage of carcass, and noncarcass fat depots and the more saturated fatty acid profile observed in the meat of the RES lambs (Santos et al., 2018a).

Additionally, it has been suggested that the efficiency of energy production for maintenance and growth can be altered by manipulating either mitochondrial number or function through epigenetic modifications (Meyer et al., 2012). Moreover, mitochondrial density or the number of mitochondria per unit of tissue is highly correlated with capillary density because the oxygen source (the capillary bed) should be closely matched with the oxygen-utilizing machinery (the mitochondrion). Consequently, the down regulation of various genes encoding proteins related to vascularization, such as serotransferrin (TF, an iron binding transport protein responsible for the transport of iron in the

plasma from sites of absorption to sites of storage and utilization, such as the heme prosthetic group of haemoglobin, myoglobin, and cytochromes), erythropoiesis (TF), and coagulation factor II (F2, which plays a role in maintaining vascular integrity during development and postnatal life) in the RES lambs, might also be related to the lower feed efficiency of this group of animals.

On the other hand, genes involved in protein synthesis, such as those encoding ribosomal proteins (*LOC101102122*, *RPLP1*, *RPL3*, and *LOC101114033*) or protease inhibitors (*CST3* and *SERPINA11*), were down-regulated in the RES group, whereas those related to proteolytic degradation (*DNAJ1*, *LOC101105132*, *LOC105605968*, and *LOC101101922*) were up-regulated, suggesting a higher catabolism of proteins. These results differ from those obtained by Keogh et al. (2016) in cattle, who observed an increased capacity for protein synthesis after a feed restriction period. However, the animals studied by Keogh et al. (2016) were fed ad libitum during the refeeding period and underwent compensatory growth, whereas this was avoided in

Table 3. Annotation clusters identified by the Functional Annotation Tool of DAVID from the list of 38 differentially expressed genes [DESeq2 (*P*. BH < 0.10)]

Term	No. ^a	<i>P</i> -value	Genes symbols ^b
Annotation cluster 1			
Enrichment score: 1.900			
Cytochrome P450, conserved site	3	0.002	<i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A24</i> , <i>LOC101110202</i>
Cytochrome P450	3	0.003	<i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A24</i> , <i>LOC101110202</i>
Monoxygenase	3	0.004	<i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A24</i> , <i>LOC101110202</i>
Oxidoreductase	4	0.005	<i>CYP2C19</i> , ND3, <i>CYP3A24</i> , <i>LOC101110202</i>
Heme	3	0.009	<i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A24</i> , <i>LOC101110202</i>
Iron	3	0.020	<i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A24</i> , <i>LOC101110202</i>
Heme binding	3	0.026	<i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A24</i> , <i>LOC101110202</i>
Iron ion binding	3	0.034	<i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A24</i> , <i>LOC101110202</i>
Metal-binding	3	0.560	<i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A24</i> , <i>LOC101110202</i>
Annotation cluster 2			
Enrichment score: 0.440			
Ribosomal protein	3	0.014	<i>RPLP1</i> , <i>LOC101114033</i> , <i>RPL3</i>
Ribonucleoprotein	3	0.017	<i>RPLP1</i> , <i>LOC101114033</i> , <i>RPL3</i>
Structural constituent of ribosome	3	0.074	<i>RPLP1</i> , <i>LOC101114033</i> , <i>RPL3</i>
Ribosome	3	0.100	<i>RPLP1</i> , <i>LOC101114033</i> , <i>RPL3</i>
Annotation cluster 3			
Enrichment score: 0.090			
Membrane	8	0.700	<i>FADS6</i> , <i>ABCA10</i> , <i>GUCY2C</i> , ND3, <i>CYP3A24</i> , <i>LOC101110202</i> , <i>SERINC2</i> , <i>PLXNA2</i>
Transmembrane helix	7	0.810	<i>FADS6</i> , <i>ABCA10</i> , <i>GUCY2C</i> , ND3, <i>LOC101110202</i> , <i>SERINC2</i> , <i>PLXNA2</i>
Transmembrane	7	0.820	<i>FADS6</i> , <i>ABCA10</i> , <i>GUCY2C</i> , ND3, <i>LOC101110202</i> , <i>SERINC2</i> , <i>PLXNA2</i>
Integral component of membrane	6	0.910	<i>FADS6</i> , <i>ABCA10</i> , <i>GUCY2C</i> , ND3, <i>LOC101110202</i> , <i>SERINC2</i>

^aNumber of genes involved.

^bDifferentially expressed genes up-regulated in the early feed restricted group are marked in bold.

our study to prevent confounding effects with early feed restriction.

Additionally, in RES lambs, there was a lower expression of genes related to cellular growth and proliferation (*ACP5*, *TF*, *RBMS2*, *F2*, and *DPYS*). Especially remarkable was the lower expression of *DPYS* in the liver of RES lambs, since this condition has been related in humans to villous atrophy in the small intestine, thus leading to malabsorption problems and failure to gain weight at the expected rate (Kuilenburg et al., 2010).

Also, this study revealed that early feed RES animals showed over-expression of several cytochrome P450 forms, such as *CYP3A24* and *CYP2C19*. The cytochrome P450 constitutes the mayor enzyme family capable of oxidizing a variety of structural compounds, including steroids, fatty acids, and xenobiotics (Zanger and Schwab, 2013). Therefore, early feed restriction might provoke differences in reproductive traits (Rhind et al., 1998; Robinson et al., 2006; Swelum et al., 2017), but also on detoxification of xenobiotics in the RES animals when compared with the ADL group. This theory seems to be supported by the presence of lower levels of alkaloids in the plasma of RES lambs when compared with those in the ADL group, as will be described below.

Also, our results are similar to previous studies in humans describing that retarded early growth is

strongly related to high plasma concentrations of the hemostatic factors fibrinogen and factor VII (Barker et al., 1992), and thus to a more severe inflammatory response (Spurlock, 1997). Additionally, the lower expression of *TF* in RES lambs might be related to increased inflammation in these animals (Ritchie et al., 1999), which seems to be corroborated by the higher expression of the *GUCY2C* gene (Wang et al., 2017). These results suggest that, compared with the ADL lambs, the RES lambs might have responded in a different way to hepatic proinflammatory stimulus, potentially expending more energy towards combating systemic inflammation and redirecting less nutrients towards growth and protein accretion (Paradis et al., 2015).

A lower expression of *CIH21orf33*, which encodes a potential mitochondrial protein with protective effects against oxidative stress, was also noticed in RES lambs. This might be related to a lower oxidative stress in the RES lambs, probably due to a reduced activity at the mitochondrial level, as will be explained below. Finally, and according to the results obtained, several other functions might have been affected by long-term effects caused by feed restriction during the suckling period; thus, genes related to cholesterol metabolism (*APOM*, *ABCA10*) or alterations in the nervous system development (*NUFIP2* and *PLXNA2*) were differentially expressed when comparing the lamb groups.

Table 4. Enriched KEGG terms from the list of 38 differentially expressed genes [DESeq2 (*P*. BH < 0.10)]

Enriched KEGG pathways	No. ^a	<i>P</i> -value	Genes symbol ^b
Linoleic acid metabolism	3	<0.001	<i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A24</i> , <i>LOC101110202</i>
Retinol metabolism	3	0.001	<i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A24</i> , <i>LOC101110202</i>
Steroid hormone biosynthesis	3	0.001	<i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A24</i> , <i>LOC101110202</i>
Chemical carcinogenesis	3	0.001	<i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A24</i> , <i>LOC101110202</i>
Ribosome	3	0.025	<i>LOC101114033</i> , <i>RPL3</i> , <i>RPLP1</i>
Metabolic pathways	7	0.045	<i>ACOX3</i> , <i>ACP5</i> , <i>ACSM3</i> , <i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A24</i> , <i>DPYS</i> , <i>LOC101110202</i>
Pantothenate and CoA biosynthesis	1	0.046	<i>DPYS</i>
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	1	0.068	<i>ACOX3</i>
Protein processing in endopl. reticulum	2	0.072	<i>DNAJ1</i> , <i>LOC101105132</i>
α -Linolenic acid metabolism	1	0.073	<i>ACOX3</i>
Butanoate metabolism	1	0.073	<i>ACSM3</i>
β -Alanine metabolism	1	0.092	<i>DPYS</i>
Fatty acid degradation	1	0.106	<i>ACOX3</i>
Drug metabolism—other enzymes	1	0.108	<i>DPYS</i>
Glycine, serine, threonine metabolism	1	0.118	<i>GCAT</i>
Mineral absorption	1	0.120	<i>TF</i>
Fatty acid metabolism	1	0.122	<i>ACOX3</i>
ABC transporters	1	0.158	<i>ABCA10</i>
PPAR signaling pathway	1	0.176	<i>ACOX3</i>
Peroxisome	1	0.197	<i>ACOX3</i>

^aNumber of genes involved in the KEGG term.

^bDifferentially expressed genes up-regulated in the early feed restricted group are marked in bold.

However, there is a tissue-specific modulation of messenger RNAs (mRNA), so the existence of differences at the tissue level does not guarantee the same effect at other locations (Tizioto et al., 2015).

When analyzed using DAVID software, the identified functional gene clusters were related to the cytochrome P450, ribosome and ribosomal proteins, and several components of the membrane/transmembrane cell, among others (Table 3). Moreover, KEGG annotation and enrichment analysis with the `kegga` function of the `edgeR` package

allowed us to identify those enriched pathways in which DE genes were involved (Table 4).

Metabolomic Profiling

Also, a nontargeted metabolomic profile was assessed as a key tool to identify metabolic pathways modified by early feed restriction, because this procedure aims to detect, identify, and quantify a total population of low molecular weight compounds that might have a significant impact on

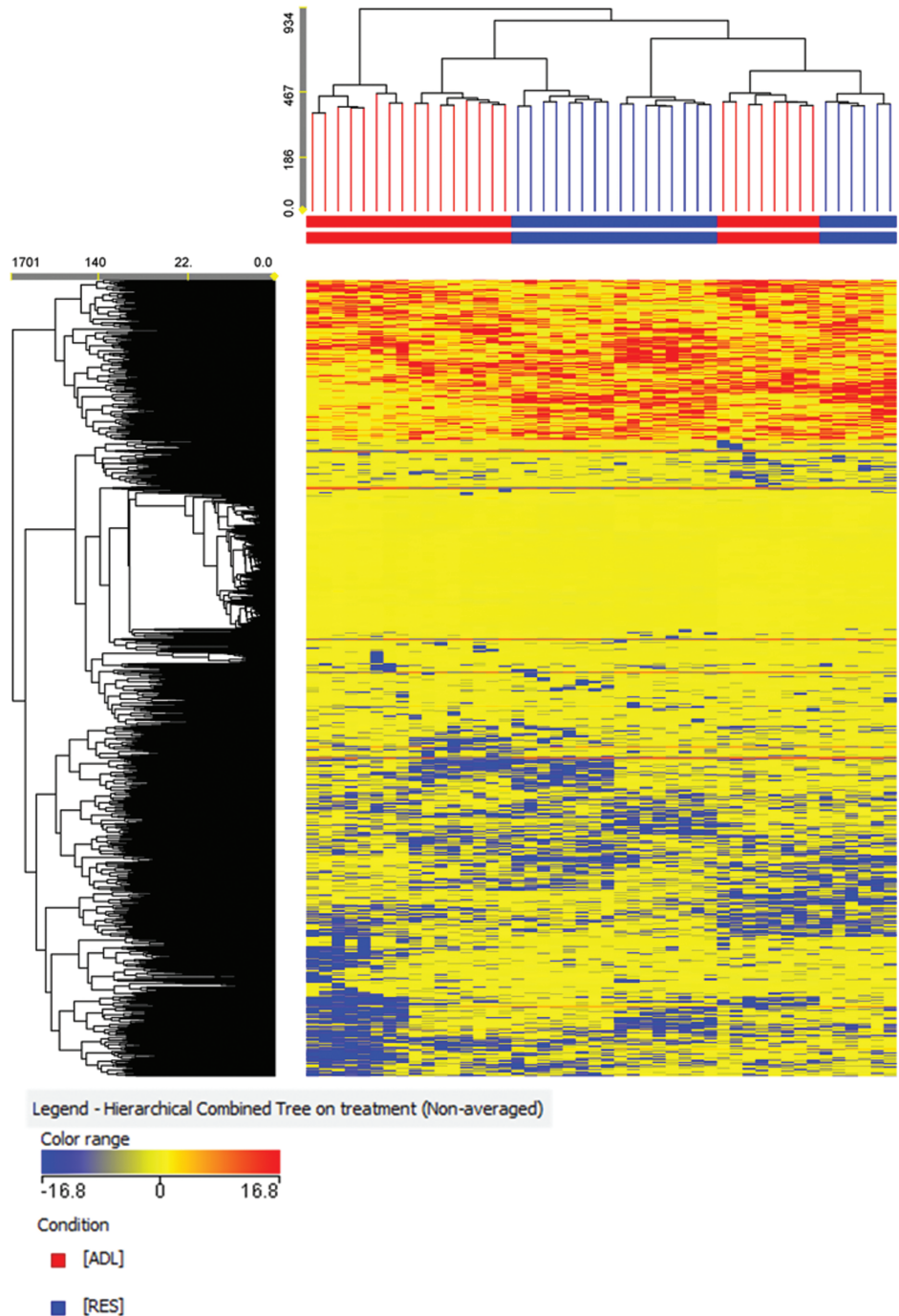


Figure 1. Not averaged unsupervised cluster analysis of the plasma metabolomic profile of fattening lambs fed ADL or RES during the suckling period. Clusters were generated on the basis of fold-change heat maps using an Euclidean similarity (linkage rule: Ward).

metabolic, immunological, and physiological processes (Krastanov, 2010). The metabolomic assay enabled the deconvoluting of 4,026 metabolites in the plasma of the animals studied. The unsupervised hierarchical cluster analysis, produced on the basis of the fold-change-based heatmap, showed 3 main clusters (Figure 1). A tendency to differentiate the treatments according to metabolic profile could be observed from this unsupervised approach (no mixed clusters could be identified, and an intra-cluster homogeneity was observed for each of the 3 clusters). Nonetheless, a subcluster of ADL animals clustered together with the RES group, likely suggesting that the diet restriction was not the only clustering factor. However, clustering became evident when a supervised PLS-DA multivariate approach was adopted (Figure 2), as confirmed by a 100% accuracy after model N-fold validation. As expected, this latter statistical approach was more efficient in discriminating ADL vs. RES animals based on long-term changes of the plasma metabolome profile promoted by early feed restriction. In any case, the ANOVA analysis revealed that only 198 metabolites showed significant differences between groups, 38 of them being identified with the database used. From this set of compounds, 25 metabolites were relatively more accumulated and 13 relatively less accumulated in the RES when compared with the ADL lambs (Table 5).

Table 5 lists the known compounds detected, grouped into several categories. The reduced calpeptin (inhibitor of calpain protease) content in the RES lambs confirms the higher catabolism of proteins in these animals. Additionally, the over-accumulation of some lipid metabolites [such as MG(0:0/14:0/0:0), DG(16:0/16:0/0:0)] and 3-hydroxysuberic acid (a metabolite derived from the ω -oxidation, which is considered a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders) in RES lambs seems to corroborate that β -oxidation might have been negatively affected

by early feed restriction. Under conditions interfering with β -oxidation, such as carnitine deficiency or a deficiency in an enzyme of β -oxidation (Brass and Beyerinck, 1988), fatty acids might have been accumulated in the RES animals if not entering the mitochondria, thus impairing energy production and feed efficiency. In fact, a recent study has demonstrated that growth rates of growing lambs can be improved by including carnitine in the diet (Feroozandeh et al., 2014). Another research has demonstrated diacylglycerol accumulation in skeletal muscle and liver when defects in mitochondrial fatty acid oxidation take place, which is associated with muscle and hepatic insulin resistance (Erion and Shulman, 2010). Moreover, modifications in satellite cell proliferation occur under calorie restriction (Halevy et al., 2000), which might inhibit muscle cell formation and subsequent muscle cell growth in neonates, thus lowering growth rates and feed efficiency due to the reduction in carcass muscle content relative to fat (Bark et al., 1992). These findings are also pertinent to our restricted lambs, which presented a trend towards increased intramuscular fat accretion (Santos et al., 2018a); this circumstance suggests that improving the activity of certain respiratory chain complexes might increase both lipid catabolism and feed efficiency traits (Ojano-Dirain et al., 2005).

However, the levels of a very-long-chain fatty acid (C26:0), 3-oxo-hexacosanoic acid, were reduced in the RES group. Very-long-chain fatty acids are oxidized by peroxisomal β - and α -oxidation pathways, which are essentially chain shortening pathways; when a medium chain length of approximately 8 carbons is reached, the fatty acid is transferred to the mitochondria as a carnitine derivative, and β -oxidation is completed (Carrillo et al., 2016). Consequently, the reduced 3-oxo-hexacosanoic acid levels in the RES group might indicate a higher enzymatic activity at a peroxisomal level in these animals.

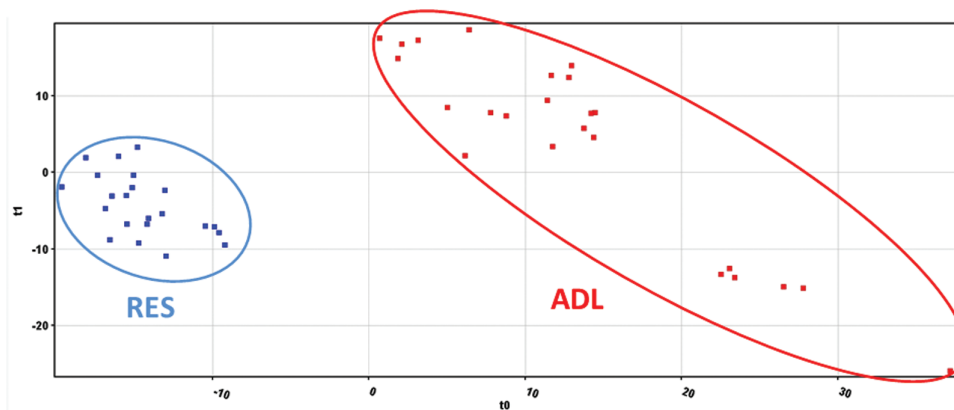


Figure 2. PLS-DA of plasma samples using the metabolomic profile of fattening lambs fed ADL or RES during the suckling period.

Table 5. List of identified metabolites up- or down-accumulated in plasma samples from early feed RES fattening lambs when compared with those fed ADL during the suckling period

Metabolite	<i>P</i> (corr) ^a	FC ^b	Regulation ^c
Lipid metabolites			
3-Oxohexacosanoic acid	0.096	23	down
1-Linoleoyl Glycerol	0.025	435	down
MG(0:0/14:0/0:0)	0.002	529	up
1-Monopalmitin	8.91E-09	16,522	up
DG(16:0/16:0/0:0)	0.013	1,699	up
PI(22:1(11Z)/0:0)	9.68E-04	1,005	up
PS(14:1(9Z)/14:1(9Z))	4.43E-06	8,888	up
PS(20:1(11Z)/0:0)	0.020	72	up
PS(22:0/18:1(9Z))	0.001	234	up
3-Hydroxysuberic acid	0.045	39	up
Methyl 4-[2-(2-formyl-vinyl)-3-hydroxy-5-oxo-cyclopentyl]-butanoate	0.099	125	up
Steroid ester			
1,3,5(10)-Estratrien-2,3-dial-17-one-2-methyl ether	0.027	178	down
11β,17β-Dihydroxy-9α-fluoro-17α-methyl-5β-androstan-3-one	2.28E-07	16,074	up
Sphingolipids			
C17 Sphinganine	3.26E-04	1,545	down
Cer(t18:0/16:0)	0.002	452	up
Vitamin D metabolism			
1α,25-dihydroxy-23,24-dinorvitamin D3	0.020	82	up
Aminoacid metabolism			
Ser Gly His	0.085	39	down
Calpeptin	0.025	98	down
NAc-FnorLRF-amide	0.021	45	up
Phe His	0.037	163	up
Others			
Melilotocarpan E	0.004	742	down
Prosopinine	0.011	204	down
Manoalide	4.62E-05	3,227	down
Pinacidil	0.045	147	down
Pymetrozine	0.011	240	down
CAY10550	0.005	713	down
CAY10583	0.058	103	down
Panaxxytriol	0.001	295	up
Oxaprozine	1.15E-04	1,409	up
<i>p</i> -Hydroxytiaprofenic acid	8.27E-09	14,511	up
BILA 2185BS	7.01E-10	12,745	up
Idebenone metabolite (benzenhexanoic acid, 2,5-dihydroxy-3,4-dimethoxy-6-methyl-)	7.29E-04	2,235	up
2-Thio-Acetyl MAGE	1.81E-09	7,094	up
Hemibrevetoxin B	2.51E-07	4,557	up
β-L-Fucose 1-phosphate	3.47E-05	2,374	up
7-Hydroxy-5-heptynoic acid	0.012	324	up
7-Methyl-2-hydroxy-6-oxoocta-2,4-dienoate	1.89E-04	1,777	up
Diethyl oxalpropionate	0.075	140	up

^aBonferroni multiple testing correction.

^bFC = fold change.

^cAnalysis is done considering RES vs. ADL; hence, “up” means that the compound is over-accumulated in RES, compared with ADL.

Peroxisomes are also involved in oxidative stress (H₂O₂ production), inflammation (including platelet aggregation), and other catabolic processes, such as amino acids or xenobiotics metabolism (Terlecky, 2012), processes that were identified as being

modified by early feed restriction with the transcriptome profile (Table 2). These effects were corroborated by some of the metabolites summarized in Table 5. For example, the inflammatory profile of RES lambs was supported by the over-accumulation

of ceramide [Cer(t18:0/16:0)], and the lower levels of a precursor of ceramide (C17 Sphinganine) when compared with the ADL animals. This is because the sphingolipid ceramide takes part in arachidonic acid (AA) release, which is used for prostaglandin E2 (PGE2) production (Nixon, 2009).

In addition, the over-accumulation of phosphatidylserine [e.g., PS(14:1(9Z)/14:1(9Z)), PS(20:1(11Z)/0:0), and PS(22:0/18:1(9Z)), which are complex lipids facing the inner side of the membrane cell] in the plasma of RES lambs is consistent with the increased expression of *SERINC2*, a carrier protein that incorporates serine into membranes and facilitates the synthesis of 2 serine-derived lipids, phosphatidylserine, and sphingolipids (Inuzuka et al., 2005). However, phosphatidylserine plays a role in blood coagulation and apoptosis; thus, considering the lower expression of the gene encoding coagulation factor II (F2) and other coagulation-related proteins (e.g., APOH and TF) in RES lambs, we cannot discard the accumulation of phosphatidylserine metabolites in RES lambs as a mechanism to compensate for another disorder promoted by the long-term effects of early feed restriction. The reduced levels of calpeptin in RES lambs, which inhibits both collagen- and thrombin-induced aggregation of platelets, also seem to support these results.

Moreover, CYP constitutes the major enzyme family capable of oxidizing a variety of structurally unrelated compounds, including steroids, fatty acids, and xenobiotics (Zanger and Schwab, 2013), so the higher expression of some of these genes in RES lambs (e.g., *CYP2C19* and *CYP3A24*, Table 2) might also explain the reduced accumulation of alkaloids (e.g., prosopinine), flavonoids (e.g., melilotocarpan E), and terpenes (e.g., manoalide) in the RES group. However, it is also possible that the higher hepatic catabolism of alkaloids in the RES group might have promoted the activation and appearance of more toxic metabolites, such as pyrroles (Cheeke, 1994), thus also impairing feed efficiency.

Finally, as described in Table 5, other metabolites with different abundances in the experimental groups were related to steroids, such as estradiol or testosterone, whose metabolism (mainly mediated by CYP1, CYP2, and CYP19) might have been affected by the restricted feed intake during the suckling period. These changes might involve long-term effects on reproductive traits (Rhind et al., 1998; Robinson et al., 2006; Swelum et al., 2017), which will need to be clarified in further experiments. Vitamin D metabolism (CYP24)

and xenobiotic detoxification (CYP1, CYP2, and CYP3) might also have been affected following feed restriction, as suggested by other metabolites described in Table 5. These results were corroborated by DE genes, as previously described for the transcriptomic profile (Table 2). Thus, results obtained with these different “-omics” approaches, when considered together, support that early postnatal nutrition promotes molecular mechanisms with functional effects and consequences on feed efficiency. It must be stressed, however, that the causes behind lower feed efficiency traits might be multifactorial, so the effect of early feed restriction on the gastrointestinal microbiome (which was beyond the scope of the present study) might also have a role (Myer et al., 2016).

CONCLUSIONS

In conclusion, according to the results of the present study, early feed restriction during the postnatal period seems to be involved in metabolic programming, thus impairing feed efficiency traits during the fattening period of Merino lambs. This effect is mainly related to long-term effects on the hepatic transcriptome profile, which impairs β -oxidation of fatty acids and increases catabolism of proteins, thus altering the sources used for obtaining the energy required for maintenance and fattening. The feed restriction during the suckling period also seems to promote long-term effects on the innate immune response (e.g., inflammation), which might account for the different efficiency traits of lambs during the fattening period. Additional studies are now needed to confirm whether these factors will have an impact on the long-term health or reproductive traits since this will determine the overall sustainability and profitability of lamb production.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at *Animal Frontiers* online.

LITERATURE CITED

- Alexandre, P. A., L. J. Kogelman, M. H. Santana, D. Passarelli, L. H. Pulz, P. Fantinato-Neto, P. L. Silva, P. R. Leme, R. F. Strefezzi, L. L. Coutinho, et al. 2015. Liver transcriptomic networks reveal main biological processes associated with feed efficiency in beef cattle. *BMC Genomics*. 16:1073. doi:10.1186/s12864-015-2292-8
- Bark, L. J., T. S. Stahly, G. L. Cromwell, and J. Miyat. 1992. Influence of genetic capacity for lean tissue growth on rate and efficiency of tissue accretion in pigs fed ractopamine. *J. Anim. Sci.* 70:3391–3400. doi:10.2527/1992.70113391x

- Barker, D. J., T. W. Meade, C. H. Fall, A. Lee, C. Osmond, K. Phipps, and Y. Stirling. 1992. Relation of fetal and infant growth to plasma fibrinogen and factor VII concentrations in adult life. *BMJ* 304:148–152. doi:10.1136/bmj.304.6820.148
- Benajmini, Y., and Y. Hochberg. 1995. Controlling the false discovery rate : a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc., B.* 57:289–300. doi: 10.2307/2346101
- Brass, E. P., and R. A. Beyerinck. 1988. Effects of propionate and carnitine on the hepatic oxidation of short- and medium-chain-length fatty acids. *Biochem. J.* 250:819–825. doi:10.1042/bj2500819
- Carrillo, J. A., Y. He, Y. Li, J. Liu, R. A. Erdman, T. S. Sonstegard, and J. Song. 2016. Integrated metabolomic and transcriptome analyses reveal finishing forage affects metabolic pathways related to beef quality and animal welfare. *Sci. Rep.* 6:25948. doi:10.1038/srep25948.
- Cheeke, P. R. 1994. a review of the functional and evolutionary roles of the liver in the detoxification of poisonous plants, with special reference to pyrrolizidine alkaloids. *Vet. Hum. Toxicol.* 36:240–247.
- Davies, D. A. R., and J. B. Owen. 1967. The intensive rearing of lambs 1. Some factors affecting performance in the liquid feeding period. *Anim. Prod.* 9:501–508. doi:10.1017/S0003356100042070
- Erion, D. M., and G. I. Shulman. 2010. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nat. Med.* 16:400–402. doi:10.1038/nm0410-400.
- Foroozandeh, A. D., H. R. Amini, G. R. Ghalamkari, M. Shahzeydi, and S. M. Nasrollahi. 2014. The effect of fat type and l-carnitine administration on growth, feed digestibility and blood metabolites of growing Afshari lambs. *Livest. Sci.* 164:67–71. doi:10.1016/j.livsci.2014.03.019
- Galvani, D. B., C. C. Pires, C. H. Hübner, S. Carbalho, and T. P. Wommer. 2014. Growth performance and carcass traits of early-weaned lambs as affected by the nutritional regimen of lactating ewes. *Small Rumin. Res.* 120:1–5. doi: 10.2016/j.smallrumres.2014.03.0080921-4488
- Greenwood, P. L., A. S. Hunt, and A. W. Bell. 2004. Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: IV. Organ growth. *J. Anim. Sci.* 82:422–428. doi:10.2527/2004.822422x
- Halevy, O., A. Geyra, M. Barak, Z. Uni, and D. Sklan. 2000. Early posthatch starvation decreases satellite cell proliferation and skeletal muscle growth in chicks. *J. Nutr.* 130:858–864. doi:10.1093/jn/130.4.858
- Inuzuka, M., M. Hayakawa, and T. Ingi. 2005. Serinc, an activity-regulated protein family, incorporates serine into membrane lipid synthesis. *J. Biol. Chem.* 280:35776–35783. doi:10.1074/jbc.M505712200
- Ji, B., B. Ernest, J. R. Gooding, S. Das, A. M. Saxton, J. Simon, J. Dupont, S. Métayer-Coustard, S. R. Campagnaand, and B. H. Voy. 2012. Transcriptomic and metabolomic profiling of chicken adipose tissue in response to insulin neutralization and fasting. *BMC Genomics* 13:441. doi:10.1186/1471-2164-13-441
- Keogh, K., D. A. Kenny, P. Cormican, A. K. Kelly, and S. M. Waters. 2016. Effect of dietary restriction and subsequent re-alimentation on the transcriptional profile of hepatic tissue in cattle. *BMC Genomics.* 17:244. doi:10.1186/s12864-016-2578-5
- Krastanov, A. 2010. Metabolomics - The state of art. *Biotechnol. Equip.* 24:1537–1543. doi:10.2478/V10133-010-0001-y
- Kuilenburg, A. B. P. Van, D. Dobritzsch, J. Meijer, R. Meinsma, J. Benoist, B. Assmann, S. Schubert, G. F. Hoffmann, M. Duran, M. C. De Vries, et al. 2010. Dihydropyrimidinase deficiency : phenotype, genotype and structural consequences in 17 patients. *Biochim. Biophys. Acta.* 1802:639–648. doi:10.1016/j.bbadis.2010.03.013
- Lucini, L., M. Pellizzoni, R. Pellegrino, G. P. Molinari, and G. Colla. 2015. Phytochemical constituents and in vitro radical scavenging activity of different aloe species. *Food Chem.* 170:501–507. doi:10.1016/j.foodchem.2014.08.034
- McCance, I. 1959. The determination of milk yield in the Merino ewe. *Aust. J. Agric. Res.* 10:839–853. doi:10.1071/AR9590839
- Meyer, A. M., J. S. Caton, B. W. Hess, S. P. Ford, and L. P. Reynolds. 2012. Epigenetics and effects on the neonate that may impact feed efficiency. In: R. A. Hill, editor, *Feed Efficiency in the Beef Industry*. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa. p. 199–223.
- Myer, P. R., J. E. Wells, T. P. Smith, L. A. Kuehn, and H. C. Freetly. 2016. Microbial community profiles of the jejunum from steers differing in feed efficiency. *J. Anim. Sci.* 94:327–338. doi:10.2527/jas.2015-9839
- Nixon, G. F. 2009. Sphingolipids in inflammation: pathological implications and potential therapeutic targets. *Br. J. Pharmacol.* 158:982–993. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00281.x
- Ojano-Dirain, C., M. Iqbal, T. Wing, M. Cooper, and W. Bottje. 2005. Glutathione and respiratory chain complex activity in duodenal mitochondria of broilers with low and high feed efficiency. *Poult. Sci.* 84:782–788. doi: 10.1093/ps/84.5.782
- Paradis, F., S. Yue, J. R. Grant, P. Stothard, J. A. Basarab, and C. Fitzsimmons. 2015. Transcriptomic analysis by rna sequencing reveals that hepatic interferon-induced genes may be associated with feed efficiency in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 93:3331–3341. doi:10.2527/jas.2015-8975
- Pertea, M., D. Kim, G. M. Pertea, J. T. Leek, and S. L. Salzberg. 2016. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat. Protoc.* 11:1650–1667. doi:10.1038/nprot.2016.095
- Rhind, S. M., D. A. Elston, J. R. Jones, M. E. Rees, S. R. McMillen, and R. G. Gunn. 1998. Effects of restriction of growth and development of Brecon Cheviot ewe lambs on subsequent lifetime reproductive performance. *Small Rumin. Res.* 30:121–126. doi:10.1016/S0921-4488(98)00103-5
- Ritchie, R. F., G. E. Palomaki, L. M. Neveux, O. Navolotskaia, T. B. Ledue, and W. Y. Craig. 1999. Reference distributions for the negative acute-phase serum proteins, albumin, transferrin and transthyretin: a practical, simple and clinically relevant approach in a large cohort. *J. Clin. Lab. Anal.* 13:273–279. doi:10.1002/(SICI)1098-2825(1999)13:6<273::AID-JCLA4>3.0.CO;2-X
- Robinson, J. J., C. J. Ashworth, J. A. Rooke, L. M., Mitchell, and T. G. McEvoy. 2006. Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126:259–276. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.08.006
- Roseboom, T. J., R. C. Painter, A. F. van Abeelen, M. V. Veenendaal, and S. R. de Rooij. 2011. Hungry in the womb: what are the consequences? Lessons from the Dutch famine. *Maturitas.* 70:141–145. doi:10.1016/j.maturitas.2011.06.017
- Ruchat, S. M., L. Bouchard, and M. F. Hivert. 2014. Early infant nutrition and metabolic programming: what are the potential molecular mechanisms? *Curr. Nutr. Rep.* 3:281–288. doi:10.1007/s13668-014-0088-0

- Santos, A., F. J. Giráldez, J. Mateo, J. Frutos, and S. Andrés. 2018a. Programming Merino lambs by early feed restriction reduces growth rates and increases fat accretion during the fattening period with no effect on meat quality traits. *Meat Sci.* 135:20–26. doi:10.1016/j.meatsci.2017.08.007
- Santos, A., C. Valdés, F.J. Giráldez, S. López, J. France, J. Frutos, M. Fernández, and S. Andrés. 2018b. Feed efficiency and the liver proteome of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period. *Animal*. doi:10.1017/S1751731118000046
- Spurlock, M. E. 1997. Regulation of metabolism and growth during immune challenge: an overview of cytokine function. *J. Anim. Sci.* 75:1773–1783. doi:10.2527/1997.7571773x
- Swelum, A. A., M. Ayadi, I. Alhidary, A. Alowaimer, and M. Abouheif. 2017. The relationships between body fatness, leptin, testosterone, and reproductive performance in ram lambs as affected by level and frequency of feeding. *Theriogenology*. 89:79–85. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.10.013
- Terlecky, S. R., L. J. Terlecky, and C. R. Giordano. 2012. Peroxisomes, oxidative stress, and inflammation. *World J. Biol. Chem.* 3:93–97. doi:10.4331/wjbc.v3.i5.93
- Tizoto, P. C., L. L. Coutinho, J. E. Decker, R. D. Schnabel, K. O. Rosa, P. S. Oliveira, M. M. Souza, G. B. Mourão, R. R. Tullio, A. S. Chaves, et al. 2015. Global liver gene expression differences in nelore steers with divergent residual feed intake phenotypes. *BMC Genomics*. 16:242. doi:10.1186/s12864-015-1464-x
- Vincent, A., I. Louveau, F. Gondret, C. Tréfeu, H. Gilbert, and L. Lefaucheur. 2015. Divergent selection for residual feed intake affects the transcriptomic and proteomic profiles of pig skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* 93:2745–2758. doi:10.2527/jas.2015-8928
- Wagner, G. P., K. Kin, and V. J. Lynch. 2012. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theory Biosci.* 131:281–285. doi:10.1007/s12064-012-0162-3
- Wang, G., C. Zhao, M. Chen, S. Chen, C. Chang, and C. Xu. 2017. Relationship analysis between gene expression profiles and rat liver cirrhosis occurrence. *Afr. J. Biotechnol.* 16:147–162. doi:10.5897/AJB2016.15718
- Weber, K. L., B. T. Welly, A. L. Van Eenennaam, A. E. Young, L. R. Porto-Neto, A. Reverter, and G. Rincon. 2016. Identification of gene networks for residual feed intake in Angus cattle using genomic prediction and rna-seq. *Plos One*. 11:e0152274. doi:10.1371/journal.pone.0152274
- Zanger, U. M., and M. Schwab. 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* 138:103–141. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.12.007
- Zheng, A., J. Luo, K. Meng, J. Li, W. L. Bryden, W. Chang, S. Zhang, L. X. Wang, G. Liu, and B. Yao. 2016. Probiotic (*Enterococcus faecium*) induced responses of the hepatic proteome improves metabolic efficiency of broiler chickens (*Gallus gallus*). *BMC Genomics* 17:89. doi:10.1186/s12864-016-2371-5

Capítulo III

Programming Merino lambs by early feed restriction reduces growth rates and increases fat accretion during the fattening period with no effect on meat quality traits

Publicado en: Meat Science



Programming Merino lambs by early feed restriction reduces growth rates and increases fat accretion during the fattening period with no effect on meat quality traits



Alba Santos^a, F. Javier Giráldez^a, Javier Mateo^b, Javier Frutos^a, Sonia Andrés^{a,*}

^a Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-Universidad de León, Finca Marzanas s/n, 24346, Grulleros, León, Spain

^b Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus Vegazana s/n, 24071, León, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Feed restriction
Feed efficiency
Myogenesis
Intramuscular fat
Lamb

ABSTRACT

The objective of the study was to determine the effect of early feed restriction on carcass and meat quality traits in Merino lambs. Twenty-four male Merino lambs (4.81 ± 0.256 kg) were assigned to two groups (12 animals in each group). The first group (*ad libitum*, ADL) was kept permanently with the dams. The second group (restricted, RES) was milk-restricted. After weaning (15 kg), daily feed intake of all lambs was identical, but a lower gain: feed ratio was recorded in the RES group (0.320 vs. 0.261; $P < 0.001$). After animals were slaughtered (27 kg), lower ultimate pH and reduced yellow colouration of subcutaneous fat was recorded in meat from the RES lambs when compared to ADL group, whereas a trend towards a significant increment of intramuscular fat content and no effect on meat quality traits was observed in the RES lambs. Early feed restriction may be useful to increase intramuscular fat accretion in Merino lambs during the fattening period.

1. Introduction

Meat from fattened lambs in Mediterranean countries is fairly heterogeneous as far as organoleptic characteristics are concerned. This is due to the variation in the composition of high-grain diets administered for several months, but also the interaction with pre- and post-slaughter handling factors (Beriain, Purroy, Treacher, & Bas, 2000). Understanding how these factors affect carcass and meat quality is very important for the lamb meat industry, since consumers need to be assured that quality, and flavour in particular, are consistent in a particular product (e.g., protected geographical indications).

In this sense, both fetal and postnatal programming of skeletal muscle and adipose tissue development may have substantial effects on economic viability of the livestock industry through impacts on feed efficiency and product quality. For example, it is well known that myogenesis, which affects the number of muscle fibres formed, during the prenatal period might be impaired by inadequate maternal nutrition, since skeletal muscle has a lower priority in nutrient partitioning compared with the brain and heart (Sen et al., 2016). This fetal programming also promotes a decreased growth rate and increased adiposity, thus affecting meat quality traits even when the animal is slaughtered after a period of fattening (Daniel, Brameld, Craigon, Scollan, & Buttery, 2007; Meyer, Caton, Hess, Ford, & Reynolds, 2012;

Rehfeldt et al., 2011). However, there is only limited evidence of the early postnatal programming of meat quality traits in ruminant livestock. Consequently, precise knowledge regarding the effect of early feed restriction on carcass and meat quality traits in fattening lambs is required to understand the biological basis of the variability of these parameters, and to enable improved control of the quantity and quality of animal products (Listrat et al., 2016).

The present study was carried out to investigate the effects of early postnatal feed restriction during the suckling period on growth rate, carcass composition, muscle fibre characteristics (e.g., diameter) and meat quality traits in lambs. Our initial hypothesis was that early feed restriction promotes long-term effects, thus affecting meat quality traits independent of dry matter intake during the fattening period.

2. Material and methods

2.1. Care and use of animals

All handling practices involving animals followed the recommendations of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes and the IGM-CSIC Animal Experimentation Committee (protocol number 2015-04).

* Corresponding author.

E-mail address: sonia.andres@eae.csic.es (S. Andrés).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.08.007>

Received 17 May 2017; Received in revised form 17 August 2017; Accepted 18 August 2017

Available online 19 August 2017

0309-1740/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

2.2. Animal diets and sampling

Twenty-four male Merino lambs, penned individually with their corresponding dam during the suckling period, were used in this experiment. The lambs were stratified on the basis of live body weight (BW) at birth (average 4.81 ± 0.256 kg), and then assigned randomly to one of two experimental groups (12 animals per group) during the suckling period. The first group of lambs (*ad libitum*, ADL) were kept permanently with dams. The second group (restricted, RES) were separated from dams daily from 9:00 am to 6:00 pm. Dams of the RES group were injected with oxytocin to remove alveolar milk and then milked at 5:00 pm before the reintroduction of lambs. Lambs were weighed twice weekly throughout the experiment. When lambs reached individual BWs of 13.5 kg they were weaned progressively until reaching 15 kg; this involved free access to a complete pelleted diet (CPD) and alfalfa, combined with only 2 h per day with the dam. Animals were then penned individually, allowed free access to fresh drinking water and were offered the same CPD at the same level (35 g/kg BW) to avoid differences in dry matter intake (DMI) during the fattening period. Thus, any effects observed during the fattening period could be explained by early feed restriction. The average daily gain (ADG) was calculated by linear regression between the lamb body weight and the weighing day. All of the lambs received CPD once a day at 09:00 am; the amount of feed offered was adjusted twice a week based on BW. Ingredients and chemical composition of CPD are summarised in Table 1.

2.3. Slaughtering procedure and carcass characteristics

Nine slaughter days (35 days elapsed between the first and the last one) were programmed (6 days with two lambs each and 3 days with four lambs each) since lambs were slaughtered as they reached the target body weight (27 kg). Then, feed and water were withdrawn, and after 1 h each lamb was weighed again (slaughter BW). Animals were immediately stunned, slaughtered by exsanguination from the jugular vein, eviscerated and skinned. Total rumen contents of each lamb were sampled and immediately frozen at -80 °C, awaiting fatty acid profile determination according to Morán et al. (2013).

Carcasses were weighed before and after chilling at 4 °C for 24 h. The chilling losses were calculated as the difference between hot (HCW) and cold carcass weight (CCW), expressed as a proportion of HCW. The dressing percentage was calculated as CCW and expressed as a proportion of slaughter BW. The colour parameters [$L^* a^* b^*$ coordinates (D65, 10°)] of subcutaneous fat were measured in the lumbar region with a Minolta CM-2002 chroma meter (Konica-Minolta Sensing, Inc., Germany) using the CIELAB system (Commission Internationale de L'Eclairage, 1986). The hue angle (h^*), which defines colour (0° is red;

90° is yellow), was calculated as arc tangent (b^*/a^*), and the chroma (C^*), a measure of colour intensity (0 is dull; 60 is vivid), was computed as $\sqrt{(a^{*2} + b^{*2})}$. The left side of each carcass was then divided into commercial cuts and grouped according to Colomer-Rocher, Morand-Fehr, Delfa, and Sierra Alfranca (1988). Legs, ribs and foreribs comprised the higher priced joints, shoulders comprised the medium price joints, and the lower priced joints included breast, neck and tail; each joint was weighed to determine its proportion, by weight, of the carcass.

2.4. Meat quality traits

The values of pH were measured using a pH meter (Methohm, Zofinger, Switzerland), equipped with a penetrating electrode and temperature probe. Measurements were taken in the longissimus thoracis muscle, at the level of the 6th rib on the right side of each carcass, at 0 h, 45 min and 24 h post mortem (Blanco et al., 2014). The longissimus thoracis (LT) and lumborum (LL) muscles were removed from both sides of the carcass at 24 h post mortem. The two LT portions (both sides) were mixed and used for proximate chemical analysis, in accordance with the methods described by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2003), and for fatty acid (FA) profile determination (Morán et al., 2013). The right side of LL was used to measure colour evolution and lipid peroxidation (TBARS) of raw meat samples under conditions of refrigerated storage (Andrés et al., 2013).

Cooking losses, texture and volatile compound profile of cooked meat were determined in a LL portion (left side) weighing 66.2 ± 13.0 g. The portion was vacuum-packed, cooked in a water bath at 80 °C for 30 min, then cooled with tap water and finally weighed in order to calculate water loss. Water loss was determined as the difference in weight between cooked and raw meat, expressed as percentage of raw meat. Three cubes of meat ($1 \times 1 \times 3$ cm) were obtained from the cooked muscle, with fibres running parallel to the major side of the cube. Shear force of meat was determined using a TA.XT2i texture analyser (Stable Micro Systems) fitted with a Warner-Bratzler blade and a 25-kg load cell, operating at 0.5 mm/s test speed and with the blade cutting perpendicular to the muscle fibres. After obtaining the cubes, the remaining meat was homogenised with a food processor and used for analysis of volatile compounds. Volatile compounds were determined in duplicate by GC-MS, following the method described by Villalobos-Delgado et al. (2015) with some modifications. Briefly, 2.5 g of homogenised meat was placed in a 15-ml screw-cap vial sealed with silicone/polytetrafluoroethylene septa (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Vials were sonicated in a 200-W ultrasonic water bath for 20 min at 40 °C to reach equilibration. Ultrasonic water baths were then switched off and a 75 μ m carboxen/polydimethylsiloxane coated solid-phase microextraction fibre (previously preconditioned at 300 °C for 30 min) was exposed to the vial headspace at 40 °C for 40 min. Separation and identification of volatile compounds was performed using a 7890A gas chromatograph (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA) coupled to an 5975C VLMSD selective mass spectrometer (Agilent Technologies) with triple-axis detector. Volatile compounds were separated using a DB-5 ms column (60 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m film thickness; J & W Scientific, Folsom, CA, USA). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.5 ml/min. The oven temperature programme was as follows: initial oven temperature of 38 °C held for 5 min, increased to 50 °C at 10 °C/min without holding and rising to 200 °C at 4 °C/min, and final increase of 250 °C at 50 °C/min, maintaining this temperature for 7 min. The injector and detector temperatures were 260 °C, the scanning mass range was 40 to 300 amu and the ionisation voltage 1882 V. Identification of volatile compounds was initially performed by comparing the obtained spectra with spectra from the NIST/EPA/NIH-98 Mass Spectral Database, together with personal interpretation. In addition, a series of n-alkanes (Hydrocarbons/C5-C20; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Table 1
Ingredients and chemical composition of the complete pelleted diet during the fattening period.

Ingredients, g/kg	
Barley	433
Corn	150
Soybean meal 44	237
Barley straw	150
Sodium chloride	20
Sodium bicarbonate	10
Chemical composition, g/kg DM	
DM, g/kg	900
NDF	227
ADF	121
CP	174
Fat	30
Ash	68
ME, kcal/kg	2464

was used to calculate experimental relative retention times (RRT) of volatile compounds, and compound identities were confirmed by comparing experimental RRTs with published values.

2.5. Histological examination of meat samples

For histological examination of meat samples, a 3-cm cranial section of LT was removed from the carcass of each animal and placed in a 10% formaldehyde solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Formalin-fixed samples were trimmed and processed for paraffin embedding and histological examination; haematoxylin-eosin staining was used. Photomicrographs of representative areas of each section were taken at 20 × magnification using a Leica DM2000 LED microscope. The average area (A , μm^2) of fibre was determined by measuring 20 straight muscle fibres at random per animal, using the image processing and analysis software ImageJ v1.6.0.14 (National Institutes of Health – NIH, USA). The number of fibres/cm² was also calculated.

2.6. Statistical analysis

Growth performance data, together with data on carcass characteristics and components, colour of subcutaneous fat, chemical composition, meat and rumen fatty acid profiles, volatile compounds, texture and water cooking losses, and histological data were analysed by one-way ANOVA using the GLM procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, 1999), with the suckling regime (*ad libitum* or restricted) as the only source of variation. Moreover, the pH decline of LT muscle after slaughter and the colour (L^* , a^* and b^*) and TBARS evolution of LL meat samples under refrigerated storage were analysed by repeated measures analysis using the MIXED procedure of SAS. The statistical model included the effects of suckling regime, day and their interaction. The suckling regime effect was tested against lamb nested to treatment. Residual error was used to test the effects of day and suckling regime × day interaction. Different covariance matrices were evaluated based on Schwarz's Bayesian information model fit criteria.

3. Results

3.1. Animal performance

As expected, ADG during the suckling period was reduced for RES lambs when compared to ADL group (267 vs. 191 g/d; $P < 0.001$) due to early feed restriction, whereas age at weaning (15 kg BW) was increased (42 vs. 55 d; $P < 0.001$). Moreover, significant differences in gain: feed ratio (ADG/DMI) were observed during the fattening phase (0.320 vs. 0.261 for the ADL and RES groups, respectively; $P < 0.001$) despite the similar DMI during this period of time. Thus, RES animals required a longer time during the fattening period (62 vs. 74 d for the ADL and RES groups, respectively; $P < 0.001$) to reach the intended BW at slaughter (27 kg).

3.2. Carcass and meat quality traits

Table 2 summarises the carcass characteristics and components corresponding to ADL and RES lambs. No significant differences between ADL and RES lambs were observed for hot and cold carcass weights, chilling losses or any of the carcass components. However, RES lambs showed a higher amount of kidney knob and channel fat (86 vs. 141 g; $P < 0.05$) and less yellow colouration of subcutaneous fat (h^* , 78.24 vs. 70.87, where 0° is red and 90° is yellow; b^* , 10.1 vs. 8.25 for ADL and RES lambs, respectively) when compared to the ADL group.

The evolution of muscle (LT) pH decline after slaughter and TBARS values of meat samples (LL) under refrigerated storage (at 4 °C) are summarised in Table 3. As can be observed, pH decline after slaughter was reduced in the RES lambs ($P < 0.05$). However, no differences in the evolution of meat colour (data not presented) or TBARS values were

Table 2

Carcass characteristics of fattening lambs (27 kg live body weight) fed *ad libitum* (ADL) or restricted (RES) during the suckling period.

	ADL	RES	RSD	P-value
Hot carcass weight (kg)	12.4	12.4	0.43	0.996
Cold carcass weight (kg)	11.9	12.0	0.44	0.586
Chilling losses (%)	3.50	2.74	1.982	0.356
Dressing (%)	43.5	44.0	1.58	0.448
Proportion of cuts (%)				
First category	62.7	62.0	1.61	0.299
Second category	20.0	19.6	1.06	0.425
Third category	17.4	18.4	1.47	0.093
Kidney knob and channel fat (g)	86.3	141	44.5	0.006
Subcutaneous fat colour				
L^*	68.8	69.2	2.95	0.737
a^*	2.38	2.48	1.445	0.866
b^*	10.1	8.25	1.414	0.052
hue*	78.2	70.9	7.23	0.026
Chroma	9.97	8.90	1.989	0.223

RSD: residual standard deviation; first category-higher priced joints (legs, ribs and fore ribs); second category-medium priced joints (shoulders); third category-lower priced joints (breasts, necks and tails).

Table 3

Evolution of pH (*M. longissimus thoracis* after slaughter) and TBARS values ($\mu\text{g MDA g}^{-1}$ meat; *M. longissimus lumborum* during refrigerated storage at 4 °C) of meat from fattening lambs (27 kg live body weight) fed *ad libitum* (ADL) or restricted (RES) during the suckling period.

	ADL	RES	P-value				
			RSD ₁	RSD ₂	D	T	D × T
pH							
0 h	6.40 ^a	6.67 ^a					
45 min	6.13 ^b	6.22 ^b	0.225	0.183	0.004	0.001	0.304
24 h	5.52 ^c	5.72 ^c					
TBARS							
Day 0	0.790 ^a	0.775 ^a					
Day 3	1.84 ^b	1.52 ^b	0.810	0.655	0.838	0.001	0.137
Day 7	3.38 ^c	3.84 ^c					

RSD₁: residual standard deviation to compare experimental treatments (Diet, D); RSD₂: residual standard deviation to compare the effect of time (T); ^{a, b, c} Different superscripts in the same column indicate statistical differences ($P < 0.05$) among days ($P < 0.05$).

Table 4

Chemical composition (g/100 FM, *M. longissimus thoracis*), texture (N, *M. longissimus lumborum*), cooking losses (%), *M. longissimus lumborum* and histological examination (*M. longissimus thoracis*) of meat from fattening lambs (27 kg live body weight) fed *ad libitum* (ADL) or restricted (RES) during the suckling period.

	ADL	RES	RSD	P-value
Chemical composition (g/100 FM)				
Water	76.4	76.5	0.64	0.843
Crude protein	19.3	19.5	0.83	0.641
Crude fat	1.95	2.42	0.546	0.059
Ash	1.56	1.50	0.157	0.348
Texture, shearing force (N)	65.6	64.5	25.17	0.916
Cooking losses (%)	31.5	31.5	5.04	0.972
Histological examination				
Fibre area (μm^2)	112	114	22.1	0.825
Number of fibres/cm ²	874,609	870,642	219,705.0	0.964

FM: fresh matter; RSD: residual standard deviation.

observed as a consequence of early feed restriction.

No significant differences between both groups of lambs were detected for water cooking losses or texture (Table 4). However, with regard to intramuscular fat (IMF) content, a trend towards significant higher values for the RES group was measured (1.95 vs. 2.42 g/100 g fresh matter; $P = 0.059$). None of remaining proximate chemical data (water, ash or protein content) showed statistical differences between

Table 5

Fatty acid profile (mg/100 g fresh matter) of meat (*M. longissimus thoracis*) from fattening lambs (27 kg live body weight) fed *ad libitum* (ADL) or restricted (RES) during the suckling period.

	ADL	RES	RSD	P-value
FAME	1356	2048	538.2	0.006
SFA	561	911	239.3	0.002
14:0	37.3	57.5	19.42	0.021
16:0	305	509	138.7	0.002
18:0	183	297	73.0	< 0.001
BCFA	20.5	29.0	8.89	0.033
MUFA	535	795	226.3	0.012
T <i>cis</i> -MUFA	483	700	204.9	0.019
9c-14:1	1.43	2.04	0.811	0.084
9c-16:1	21.4	32.5	10.05	0.015
9c-18:1	423	617	182.6	0.019
T <i>trans</i> -MUFA	51.7	95.2	24.07	< 0.001
10t-18:1	39.6	79.8	20.18	< 0.001
11t-18:1	4.59	4.68	2.077	0.915
PUFA	216	242	50.84	0.226
n - 3	13.9	15.7	2.85	0.148
n - 6	197	220	46.12	0.242
Total CLA	6.4	11.5	6.11	0.059
9c,11t-18:2	3.7	3.5	1.45	0.776
C18 dienes	3.7	5.4	1.71	0.022
Unknown	23.8	71.2	18.26	0.009
Fatty acid desaturation indexes				
9c-14:1/(14:0 + 9c-14:1)	3.62	3.41	0.486	0.292
9c-16:1/(16:0 + 9c-16:1)	6.38	6.03	0.735	0.269
9c-18:1/(18:0 + 9c-18:1)	69.4	67.0	2.44	0.031
Nutritional interesting indexes				
n - 6/n - 3	14.0	14.1	1.90	0.898
11t/10t	0.12	0.06	0.030	< 0.001
PUFA/SFA	0.40	0.27	0.091	0.002

FAME: fatty acid methyl esters; SFA: total saturated fatty acids (sum of 10:0, 11:0, 12:0, 13:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0, 22:0); BCFA: total branched chain fatty acids (sum of iso 14:0, iso 15:0, anteiso 15:0, iso 16:0, iso 17:0, anteiso 17:0; iso 18:0); MUFA: monounsaturated fatty acids (sum of 9c-14:1, 7c-16:1, 9c-16:1, 9c-17:1, 11c-20:1, T 18:1 *cis* and T 18:1 *trans*); T *cis*-MUFA (sum of 9c-14:1, 7c-16:1, 9c-16:1, 9c-17:1, 11c-20:1 and T 18:1 *cis*); T *trans* MUFA (sum of 4t-18:1, 5t-18:1, 6t/7t/8t-18:1, 9t-18:1, 10t-18:1, 11t-18:1, 12t-18:1, 13t/14t-18:1); PUFA: polyunsaturated fatty acids (sum of 18:2n - 6, 18:3n - 3, 18:3n - 6, 20:2n - 6, 20:3n - 6, 20:4n - 6, 20:5n - 3, 22:4n - 6, 22:5n - 3, 22:6n - 3); n - 6 (sum of 18:2n - 6, 18:3n - 6, 20:2n - 6, 20:3n - 6, 20:4n - 6, 22:4n - 6); n - 3 (sum of 18:3n - 3, 20:5n - 3, 22:5n - 3, 22:6n - 3); Total CLA: conjugated linoleic acid (sum of 9c,11t-18:2, 10t,12c-18:2, 11c,13t-18:2, 11c,13c-18:2); C18 dienes (sum of 9t,12c-18:2 and 9c,15c-18:2); RSD: residual standard deviation.

groups.

Table 5 represents the overall fatty acid groups and, nutritionally, the most important ratios and indexes in the intramuscular fat of LT muscle in lambs. Significant differences were observed in the total fatty acid methyl esters content (FAME; 1356 vs. 2048 mg/100 g fresh matter), with the RES lambs showing the highest values. This was due to a higher amount of total saturated (SFA; $P < 0.05$) and monounsaturated fatty acids (MUFA; $P < 0.05$) in this group of animals, whereas polyunsaturated fatty acids (PUFA; $P > 0.05$) were not affected by early feed restriction during the suckling period. Consequently, these values resulted in more saturated indexes for intramuscular fat in the RES group, as shown in Table 5. As far as the fatty acid profile of the ruminal content is concerned, the RES lambs showed significantly lower proportions of PUFA, especially that corresponding to n-6 (Fig. 1), whereas the remaining FAMES (for example, SFA, MUFA and BCFA) showed no difference between both groups ($P > 0.05$).

No statistical differences were found in the levels of total volatile compounds in the headspace of ADL and RES cooked lamb samples (1032 ± 216 and 930 ± 399 ng hexanal equivalent for ADL and RES lambs, respectively). Thus, results of individual volatiles are reported as percentage of the total concentration of volatile compounds (Table 6). According to the results observed, only minor changes were observed for these compounds, with a trend towards significant differences in

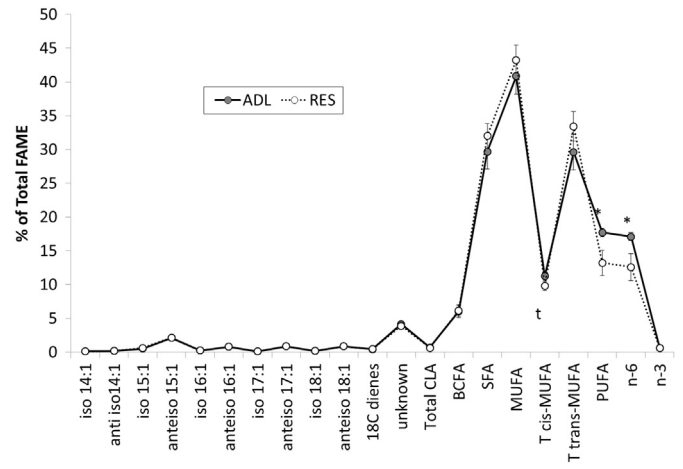


Fig. 1. Rumen fatty acid profile (% of total FAME) of fattening lambs (27 kg live body weight) fed *ad libitum* (ADL) or restricted (RES) during the suckling period. Significant differences ($P < 0.05$) were found for PUFA and n-6 fatty acids and a trend ($P = 0.058$) for total *cis*-MUFA.

some aliphatic and aldehyde compounds, and only a significant difference for 2-heptenal, the proportion of which was reduced in cooked meat of RES lambs (0.101 vs. 0.070%; $P = 0.005$).

3.3. Histological examination of meat samples

Fibre area (μm^2) and number of fibres/ cm^2 for ADL and RES lambs are summarised in Table 4. No significant differences for these parameters were detected when the histological sections of LT for ADL and RES lambs were compared.

4. Discussion

The present study was specifically designed to determine if early feed restriction during the suckling phase of lambs promotes long-term effects on carcass and meat quality traits during the fattening period. In this sense, one of the major determinants of meat quality is the ultimate pH of muscle, which is conditioned by the depletion of glycogen and accumulation of lactic acid pre- and post-slaughter. However, in the present study, the pH decline was lower in the RES lambs at all time-points (Table 3). This finding is consistent with Hopkins, Hegarty, and Farrell (2005) and suggests that early feed restriction during the suckling period decreased the glucose uptake by skeletal muscle, thus impairing glycogen synthesis, decreasing postmortem glycolysis and reducing post-slaughter pH decline (Hopkins et al., 2005). This might be due to the fact that early, moderate feed restriction reduces insulin secretion and modifies insulin sensitivity in a tissue-specific manner. As a result, less-insulin dependent tissues (for example, skeletal muscle) may become insulin resistant in order to ensure sufficient glucose uptake by fundamental organs such as brain and heart, whose development might be counteracted by calorie restriction during early life (Nurliyana, Shariff, Taib, Gan, & Tan, 2016). This early life programming underpinning insulin resistance mechanisms, which has been previously suggested to occur in lambs up to 20 kg BW by other authors (Greenwood et al., 2002), might persist after weaning, thus explaining the lower pH decline in the muscle of RES lambs after the fattening period. Moreover, an altered susceptibility to stress due to early feed restriction could also contribute to the lower pH decline. However, under the conditions of the present experiment, the change in ultimate pH of RES lambs was insufficient to produce a darker lean surface of raw meat under refrigerated storage conditions. Also, in agreement with the results of the present study, a trend towards intramuscular fat accretion has been described under insulin resistance conditions (Martínez De Morentin, Rodríguez, & Martínez, 2003), which also

Table 6

Meat volatile compounds profile, expressed as percentage by weight (ng hexanal equivalents) of total identified volatiles identified in the headspace of cooked meat (*M. longissimus lumborum*) from fattening lambs (27 kg live body weight) fed *ad libitum* (ADL) or restricted (RES) during the suckling period.

	RRT	ADL	RES	RSD	P-value
Total aliphatic hydrocarbons					
Pentane	500	0.532	0.755	0.3085	0.098
Hexane	600	0.128	0.205	0.1901	0.347
Heptane	700	1.01	0.825	1.4569	0.759
2,2,5-Trimethylhexane	778	0.008	0.022	0.0185	0.074
Octane	800	0.194	0.292	0.1247	0.073
Ethylcyclohexane	834	0.145	0.200	0.3036	0.671
Branched alkane	866	0.010	0.020	0.0305	0.438
2,2,4-Trimethylheptane	876	0.009	0.014	0.0266	0.657
Branched alkene	1039	0.192	0.145	0.0598	0.072
Acyclic aldehydes					
Pentanal	703	3.76	3.73	0.005	0.947
Hexanal	812	71.9	73.0	5.39	0.628
2-Hexenal	855	0.055	0.061	0.0285	0.646
Heptanal	898	4.30	3.96	0.437	0.078
2-Heptenal	960	0.101	0.070	0.0232	0.005
Octanal	1008	2.974	3.169	1.0286	0.655
2-Octenal	1065	0.156	0.121	0.0447	0.080
4-Nonenal	1103	0.049	0.039	0.0001	0.531
Nonanal	1110	3.01	2.91	1.420	0.864
Decanal	1210	0.013	0.012	0.0265	0.920
Ketones					
2-Butanone	611	0.038	0.039	0.0261	0.886
2-Heptanone	886	0.408	0.372	0.0742	0.259
2,3-Octanedione	988	3.98	3.94	1.377	0.941
2-Nonanone	1089	0.179	0.161	0.0520	0.422
6-Methyl-2-heptanone	955	0.071	0.080	0.0245	0.371
Aliphatic alcohols					
1-Penten-3-ol	689	0.056	0.039	0.0328	0.240
1-Pentanol	776	0.990	0.878	0.3591	0.464
1-Hexanol	871	1.69	1.41	1.833	0.717
1-Heptanol	975	0.135	0.129	0.0949	0.884
1-Octen-3-ol	984	2.60	2.05	0.770	0.107
2-Octen-1-ol	1075	0.138	0.113	0.0540	0.278
1-Octanol	1078	0.140	0.123	0.0705	0.558
Total acids					
Acetic acid	656	0.009	0.016	0.0151	0.231
Hexanoic acid	1005	0.088	0.101	0.0787	0.687
Total benzene compounds					
Benzene	660	0.058	0.048	0.0144	0.151
Toluene	769	0.179	0.207	0.0615	0.286
Benzaldehyde	968	0.152	0.153	0.0610	0.990
Others					
Unknown ^a (42 55 70)	830	0.067	0.062	0.0173	0.424
2-Pentylfuran	993	0.491	0.534	0.0111	0.731

RRT: Relative retention time.

RSD: residual standard deviation.

^a The major fragments are into brackets.

might explain lower growth rates of the RES lambs. This is due to the fact that feed efficiency of growing animals is reduced as muscle growth decreases and gives way to increased adipose deposition (Paredes et al., 2013). In the present study, it is interesting to note that the most efficient animals (ADL group) were identified in terms of growth rate, since our results indicate that feed efficiency (and growth rate) was reduced in the RES lambs due to the increased fat deposition in all parts of the carcass. However, in terms of partial efficient use of nutrients, partial efficiency of lipid accretion is greater than that of protein due to the increased energy and nutrient use required for protein turnover (Johnson, Ferrell, & Jenkins, 2003). In other words, even though the growth rate of the RES lambs was lower due to a higher fat accretion, the efficiency of energy utilisation might have been superior in these animals when compared to the ADL group.

It has been demonstrated that the growth path of lambs from birth to slaughter may affect meat quality traits (Hopkins, Stanley, Martin, Ponnampalam, & van de Ven, 2007; Hopkins, Stanley, Martin, Tonhey, & Gilmour, 2007), whereas IMF accretion increases as the

animals get older (Hocquette et al., 2010; Hopkins et al., 2007). In the present study, growth path of RES lambs was slower before and after weaning, and hence these animals were older at slaughter when compared to ADL lambs (on average, 129 vs. 104 days, respectively). However, when age was included as a covariate in the statistical model, its effect was not significant, probably due to the lack of relevant age and carcass weight differences. Therefore, other factors could be involved in fat accretion in RES lambs. For example, in agreement with previous experiments with lambs up to 20 kg BW (Greenwood, Hunt, Hermanson, & Bell, 2000), in the present study, myogenesis (and hence the number of fibres/cm²) was not limited by early feed restriction, since this takes place during the prenatal phase. In contrast, it has been suggested that the increase in the size of individual myofibres during postnatal growth might be impaired by early feed restriction in mice (White, Biérinx, Gnocchi, & Zammit, 2010). This is important, since once maximum fibre size is achieved in the muscle, nutritional energy can no longer be used for protein accretion and is deposited as fat instead (Paredes et al., 2013). Nevertheless, and again in accordance with other authors studying the effects of moderate/severe postnatal nutritional restriction in lambs of different ages (Greenwood et al., 2000; Hopkins & Tulloh, 1985), the lack of significant differences in fibre area measured in LT muscle suggests a different influence of the pre-natal period on lean growth potential in lambs.

Similarly, evidence from several studies in humans and animals has indicated that early feed restriction appears to predispose to a change in fat distribution (such as, visceral and peri-renal fat) when the circumstances allow for fat accretion, which may also involve increased metabolic risks (for example, insulin resistance). Therefore, early feed restriction can programme a rapid replenishment of fat stores, thus limiting energy expenditure and favouring fat deposition, both of which are adaptations appropriate for feed restriction (Lizárraga-Mollinedo et al., 2015; Meyer et al., 2012). Reduced mitochondrial number and/or function and vascularisation in the skeletal muscle as a consequence of early feed restriction have been suggested as possible mechanisms to explain fat accretion after undernutrition (Meyer et al., 2012; Vincent et al., 2015). In this sense, the down-regulation of several mitochondrial genes was observed in the liver of RES lambs slaughtered which might have impaired β -oxidation of fatty acids (Santos et al., 2017). Considering that a similar event might have taken place at the skeletal muscle level, this would explain a lower catabolism of fatty acids in the muscle of the RES lambs and, consequently, higher fat accretion achieved by these animals. The higher fat inclusion in these lambs also might have decreased glucose storage in the muscle, thus impairing pH decline in the RES lambs in a positive feedback loop, reinforcing insulin resistance of the muscle (Clarke, 2000).

Moreover, in the present study both intramuscular fat content and the fatty acid profile revealed that after early feed restriction, the accumulation of fat in adipocytes of several depots was enhanced. Thus, SFA and MUFA concentrations (mg/100 g fresh matter) were significantly increased in the intramuscular fat of the RES lambs; whereas those mainly incorporated into membrane phospholipids (for example, n – 3 and n – 6 polyunsaturated fatty acids, PUFA) did not show significant changes due to early feeding systems. Consequently, mainly hypertrophy (filling of existing cells with storage lipids such as triglycerides) instead of hyperplasia of adipocytes of the RES lambs might have occurred. In fact, Turyn, Stojek, and Swierczynski (2010) shed some light on the molecular mechanisms behind this effect, attributing fat storage to the increment of the expression of several genes encoding lipogenic enzymes [for example, stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1), elongase6 (Elovl6), fatty acid synthase, acetyl-CoA carboxylase, ATP-citrate lyase and malic enzyme] in adipose tissue of rats after chronic food restriction/refeeding. However, some other effects of biohydrogenation at ruminal level may also have occurred in lambs in this study, since the ruminal fatty acid profile (% of total FAME) was also more saturated in the RES lambs when compared to the ADL group.

On the other hand, it is well known that lipid peroxidation takes

place in meat during storage and these alterations may affect sensory and nutritional qualities of the meat. However, neither colour evolution (data not shown) nor TBARS were significantly different between the experimental groups in the present study, probably due to the lack of differences in PUFA-content of meat samples (Listrat et al., 2016). Furthermore, during cooking of meat, lipids, mainly PUFA, are thermally degraded, producing a number of volatile compounds, such as those found in this study (Resconi, Campo, Furnols, Montossi, & Sañudo, 2009; Sivadier, Ratel, Bouvier, & Engel, 2008). Therefore, the lack of change in PUFA content with feeding treatment is consistent with the similarity in the volatile compound profile of the meat samples. However, it should be considered that, in the present study, lambs were not fed *ad libitum* during the fattening period in order to ensure consistency in DMI during this phase. Therefore, it is possible that, even though intramuscular fat content showed a trend towards higher values in the RES lambs, this increment was not sufficiently high to affect meat quality traits.

5. Conclusions

In conclusion, under the conditions of the present study, early feed restriction during the suckling phase can impact the programming of muscle and fat tissue in lambs, thus tending to promote fat accretion (intramuscular and carcass depots) during the fattening period at the expense of achieving inferior feed efficiency traits. However, there were no effects of early feed restriction on meat quality traits. Further studies of lambs fattened under *ad libitum* feeding conditions are required to quantify the potential of this feeding strategy for increasing adiposity during the fattening period and its economic viability.

Declaration of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

This work was funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO, AGL2014-54124R). Alba Santos gratefully acknowledges receipt of a pre-doctoral grant from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (MECD, FPU15/01630). Additionally, the authors are grateful to Julio Benavides for providing histological sections of meat samples.

References

- Andrés, S., Tejido, M. L., Bodas, R., Morán, L., Prieto, N., Blanco, C., & Giráldez, F. J. (2013). Quercetin dietary supplementation of fattening lambs at 0.2% rate reduces discolouration and microbial growth in meat during refrigerated storage. *Meat Science*, *93*(2), 207–212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.08.023>.
- AOAC (2003). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (17th ed.). Gaithersburg, MD: AOAC International.
- Beriain, M. J., Purroy, A., Treacher, T., & Bas, P. (2000). Effect of animal and nutritional factors and nutrition on lamb meat quality. *Cahiers Options Méditerranéennes*, *52*, 75–86. Retrieved from <http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=600313>.
- Blanco, C., Giráldez, F. J., Prieto, N., Morán, L., Andrés, S., Benavides, J., ... Bodas, R. (2014). Effects of dietary inclusion of sunflower soap stocks on nutrient digestibility, growth performance, and ruminal and blood metabolites of light fattening lambs. *Journal of Animal Science*, *92*(9), 4086–4094. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2014-7693>.
- CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) (1986). *Colorimetry* (2nd ed.). Vienna, Austria: CIE Publication No. 15.2.
- Clarke, S. D. (2000). Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: A mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *British Journal of Nutrition*, *83*(S1), S59–S66. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114500000969>.
- Colomer-Rocher, F., Morand-Fehr, P., Delfa, R., & Sierra Alfranca, I. (1988). Métodos normalizados para el estudio de los caracteres cuantitativos y cualitativos de las canales caprinas y ovinas. *Cuadernos INIA*, *17* N°.
- Daniel, Z. C. T. R., Brameld, J. M., Craigon, J., Scollan, N. D., & Buttery, P. J. (2007). Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on lamb carcass characteristics and muscle fiber composition. *Journal of Animal Science*, *85*(6), 1565–1576. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2006-743>.
- Greenwood, P. L., Hunt, A. S., Hermanson, J. W., & Bell, A. W. (2000). Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: II. Skeletal muscle growth and development. *Journal of Animal Science*, *78*(1), 50–61. <http://dx.doi.org/10.2527/2000.78150x>.
- Greenwood, P. L., Hunt, A. S., Slepetic, R. M., Finnerty, K. D., Alston, C., Beermann, D. H., & Bell, A. W. (2002). Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: III. Regulation of energy metabolism. *Journal of Animal Science*, *80*(11), 2850–2861. <http://dx.doi.org/10.2527/2002.80112850x>.
- Hocquette, J. F., Gondret, F., Baéza, E., Médale, F., Jurie, C., & Pethick, D. W. (2010). Intramuscular fat content in meat-producing animals: Development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal*, *4*(2), 303–319. <http://dx.doi.org/10.1017/S1751731109991091>.
- Hopkins, D. L., Hegarty, R. S., & Farrell, C. T. (2005). Relationship between sire estimated breeding values and the meat and eating quality of meat from their progeny grown on two planes of nutrition. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *45*(5), 525–533.
- Hopkins, D. L., Stanley, D. F., Martin, L. C., Ponnampalam, E. N., & van de Ven, R. (2007). Sire and growth path effects on sheep meat production 1. Growth and carcass characteristics. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *47*(10), 1208–1218. <http://dx.doi.org/10.1071/EA06319>.
- Hopkins, D. L., Stanley, D. F., Martin, L. C., Tonhey, E. S., & Gilmour, A. R. (2007). Genotype and age effects on sheep meat production. 3. Meat quality. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *47*(10), 1115–1164. <http://dx.doi.org/10.1071/EA06299>.
- Hopkins, D. L., Stanley, D. F., Toohey, E. S., Gardner, G. E., Pethick, D. W., & van de Ven, R. (2007). Sire and growth path effects on sheep meat production 2. Meat and eating quality. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *47*(10), 1219–1228. <http://dx.doi.org/10.1071/EA06334>.
- Hopkins, D. L., & Tulloh, N. M. (1985). Effects of severe nutritional check in early postnatal life on the subsequent growth of sheep to the age of 12–14 months: Changes in body weight, wool and skeletal growth, and effects at the cellular level. *The Journal of Agricultural Science, Cambridge*, *105*(3), 551–562. <http://dx.doi.org/10.1017/S002185960005944X>.
- Johnson, D. E., Ferrell, C. L., & Jenkins, T. G. (2003). The history of energetic efficiency research: Where have we been and where are we going? *Journal of Animal Science*, *81*(E. Suppl. 1), E27–E38.
- Listrat, A., Lebrete, B., Louveau, I., Astruc, T., Bonnet, M., & Lefaucheur, L. (2016). How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *The Scientific World Journal*. Article ID 3182746. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3182746>.
- Lizárraga-Mollinedo, E., Fernández-Millán, E., Frutos, M. G. S., De Toro-Martín, J., Fernández-Agulló, T., Ros, M., & Escrivá, F. (2015). Early and long-term under-nutrition in female rats exacerbates the metabolic risk associated with nutritional rehabilitation. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(31), 19353–19366. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.549204>.
- Martínez De Morentin, B. E., Rodríguez, M. C., & Martínez, Y. J. A. (2003). Síndrome metabólico, resistencia a la insulina y metabolismo tisular. *Endocrinología y Nutrición*, *50*(8), 324–333. [http://dx.doi.org/10.1016/S1575-0922\(03\)74546-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1575-0922(03)74546-X).
- Meyer, A. M., Caton, J. S., Hess, B. W., Ford, S. P., & Reynolds, L. P. (2012). Epigenetics and effects on the neonate that may impact feed efficiency. In R. A. Hill (Ed.), *Feed Efficiency in the Beef Industry* (pp. 199–223). John Wiley & Sons Inc. <http://dx.doi.org/10.1002/9781118392331.ch13>.
- Morán, L., Giráldez, F. J., Panseri, S., Aldai, N., Jordán, M. J., Chiesa, L. M., & Andrés, S. (2013). Effect of dietary carnolic acid on the fatty acid profile and flavour stability of meat from fattening lambs. *Food Chemistry*, *138*(4), 2407–2414. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.033>.
- Nurliyana, A. R., Shariff, Z. M., Taib, M. N. M., Gan, W. Y., & Tan, K.-A. (2016). Early nutrition, growth and cognitive development of infants from birth to 2 years in Malaysia: A study protocol. *BMC Pediatrics*, *16*(160), 1–7. <http://dx.doi.org/10.1186/s12887-016-0700-0>.
- Paredes, S. P., Kalbe, C., Jansman, A. J. M., Verstegen, M. W. A., van Hees, H. M., Lösel, D., & Rehfeldt, C. (2013). Predicted high-performing piglets exhibit more and larger skeletal muscle fibers. *Journal of Animal Science*, *91*(12), 5589–5598. <http://dx.doi.org/10.2527/jas2013-6908>.
- Rehfeldt, C., Te Pas, M. F. W., Wimmers, K., Brameld, J. M., Nissen, P. M., Berri, C., & Oksbjerg, N. (2011). Advances in research on the prenatal development of skeletal muscle in animals in relation to the quality of muscle-based food. II – Genetic factors related to animal performance and advances in methodology. *Animal*, *5*(5), 718–730. <http://dx.doi.org/10.1017/S1751731110002454>.
- Resconi, V. C., Campo, M. M., Furnols, M. F. I., Montossi, F., & Sañudo, C. (2009). Sensory evaluation of castrated lambs finished on different proportions of pasture and concentrate feeding systems. *Meat Science*, *83*(1), 31–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.03.004>.
- Santos, A., Giráldez, F. J., Groenen, M. A. M., Madsen, O., Frutos, J., Valdés, C., & Andrés, S. (2017). Liver transcriptomic profile of fattening lambs is modified by milk intake level in the suckling period. *EAAP annual meeting 2017*. Tallinn, Estonia: Wageningen Academic Publishers.
- SAS (1999). *SAS/STAT(R) user's guide (version 8)*. 1999. Cary, NC, USA: Previous SAS term Publishing.
- Sen, U., Sirin, E., Ensöy, U., Aksoy, Y., Ulutas, Z., & Kuran, M. (2016). The effect of maternal nutrition level during mid-gestation on postnatal muscle fibre composition and meat quality in lambs. *Animal Production Science*, *56*(5), 834–843. <http://dx.doi.org/10.1071/AN14663>.
- Sivadier, G., Ratel, J., Bouvier, F., & Engel, E. (2008). Authentication of meat products: Determination of animal feeding by parallel GC-MS analysis of three adipose tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(21), 9803–9812. <http://dx.doi.org/10.1021/jf801276b>.
- Turyn, J., Stojek, M., & Swierczynski, J. (2010). Up-regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 and elongase 6 genes expression in rat lipogenic tissues by chronic food restriction

- and chronic food restriction/refeeding. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 345(1–2), 181–188. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-010-0571-x>.
- Villalobos-Delgado, L. H., Caro, I., Blanco, C., Bodas, R., Andrés, S., Giráldez, F. J., & Mateo, J. (2015). Effect of the addition of hop (infusion or powder) on the oxidative stability of lean lamb patties during storage. *Small Ruminant Research*, 125, 73–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.02.008>.
- Vincent, A., Louveau, I., Gondret, F., Tréfeu, C., Gilbert, H., & Lefaucheur, L. (2015). Divergent selection for residual feed intake affects the transcriptomic and proteomic profiles of pig skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 93(6), 2745–2758. <http://dx.doi.org/10.2527/jas2015-8928>.
- White, R. B., Biérinx, A.-S., Gnocchi, V. F., & Zammit, P. S. (2010). Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC Developmental Biology*, 10, 21. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-213X-10-21>.

Capítulo IV

Liver transcriptomic and proteomic profiles of
preweaning lambs are modified by milk replacer
restriction

Publicado en: Journal of Dairy Science



Liver transcriptomic and proteomic profiles of preweaning lambs are modified by milk replacer restriction

A. Santos, F. J. Giráldez, J. Frutos, and S. Andrés*

Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-Universidad de León, Finca Marzanas, E-24346 Grulleros, León, Spain

ABSTRACT

Prenatal and early postnatal nutrition may promote long-term effects on both feed efficiency and health of animals. Therefore, moderated milk replacer restriction during the artificial rearing period might negatively affect feed efficiency during the postweaning phases in dairy ewes. The aim of this work was to identify differentially expressed (DE) genes by RNA sequencing and differentially accumulated proteins using MALDI-TOF mass spectrometry in the liver of artificially reared Assaf lambs to identify modified metabolic pathways as a consequence of milk replacer restriction in order to find possible solutions to correct any detrimental effect caused by this factor. Forty female Assaf lambs were used in this experiment. The animals were penned individually and assigned randomly to 1 of 2 treatments groups ($n = 20$ per treatment). The first group of lambs was fed ad libitum (AL), whereas the second (restricted, RES) only received approximately 62.5% of the level of intake measured in the AL group. Eight 35-d-old lambs from each group (16 lambs in total) were harvested and a piece of liver of 8 lambs (4 AL and 4 RES lambs) was excised for transcriptomic and proteomic analysis. Differential gene expression analysis identified 386 DE genes [198 of them being annotated genes in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway], with 176 downregulated and 210 upregulated in the early feed-restricted group relative to the AL group. A total of 26 spots were also differentially accumulated proteins in the liver of the 2 groups of lambs, 10 of them being down-accumulated whereas the other 16 evolved in the opposite way in the liver of RES relative to AL lambs. Collectively, both the transcriptomic and proteomic approaches revealed an upregulation of genes participating in oxidation of fatty acids in the early feed-restricted lambs. The expression of many genes involved in the degradation of several AA (e.g. alanine, valine, isoleucine, tyrosine) was also modified

in the RES lambs, probably to render substrates for gluconeogenesis. Moreover, other genes involved in apoptosis, inflammation, or hepatic oxidative pathways were upregulated in these lambs. Finally, the expression of genes implicated in oxidative phosphorylation was modified in RES animals. Altogether all these modifications suggest that the partitioning and utilization of nutrients in the early feed-restricted lambs might have been modified, being partially responsible for changes during the replacement phase later in life.

Key words: feed efficiency, feed restriction, developmental origins of health and disease, metabolic programming

INTRODUCTION

Early feed restriction (pre- and perinatal life) modifies gene expression in several organs and tissues of the offspring, affecting not only the digestive and metabolic utilization of nutrients in different biological functions (Lillycrop et al., 2007; Altmann et al., 2012; Lan et al., 2013; Geraghty et al., 2016; Khanal and Nielsen, 2017) but also promoting metabolic disorders later in life due to nutritional programming events, as described previously in humans (González-Barranco and Ríos-Torres, 2004; Roseboom et al., 2011; Ruchat et al., 2014) and rats (Kang et al., 2011; Ellis et al., 2014). Regarding lambs, several studies have shown that metabolic programming events are caused by early feed restriction (Davies and Owen, 1967; Greenwood et al., 2004; Galvani et al., 2014), with negative long-term effects after the period of feed restriction. In this sense, previous studies have demonstrated negative consequences not only on the health status (Frutos et al., 2018) and feed efficiency traits (Santos et al., 2018c,d), but also on the onset of puberty in replacement ewes lambs (Santos et al., 2018c). However, even though we have found several studies in children (Ruchat et al., 2014), cattle (Soberon et al., 2012; Soberon and Van Amburgh, 2013; Alexandre et al., 2015), and pigs (Vincent et al., 2015), to our knowledge no studies have described the effects of early feed restriction at the gene expression level in artificially reared female Assaf lambs. There-

Received May 24, 2018.

Accepted October 15, 2018.

*Corresponding author: sonia.andres@eae.csic.es

fore, progress in this field may help us understand the mechanisms underlying nutritional programming and the adverse effects promoted by early undernutrition in replacement ewe lambs. Implementing early corrective strategies is crucial, as early feed restriction (which may happen in the farm as a consequence of environmental, health, or management conditions) might negatively affect future profitability of a dairy sheep farm. The present study aimed to identify both differentially expressed (**DE**) genes and differentially accumulated proteins (proteomics) in the liver of early feed-restricted lambs in order to understand both the mechanisms responsible for the alterations in the partitioning and utilization of nutrients of early feed-restricted lambs and those causing detrimental effects on reproductive and feed efficiency later in life in dairy sheep farms.

MATERIAL AND METHODS

Care and Use of Animals

All the recommendations of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes and the IGM-CSIC Animal Experimentation Committee (protocol number 2015-04) were carefully followed in all the handling practices involving animals.

Animal Diets and Sampling

Forty female Assaf lambs, individually penned during the artificial rearing period, were used in this experiment. The lambs were stratified based on live BW at birth (average = 4.73 ± 0.116 kg) and randomly allocated to 1 of 2 experimental treatments ($n = 20$ per dietary treatment) during the artificial rearing period. All the lambs were fed milk replacer (**MR**) 3 times daily (0830, 1400, and 2030 h) during the first week, and only twice daily (0830 and 1930 h) during the rest of the suckling period. However, whereas the first group of lambs was fed MR ad libitum (**AL**; expected intake of 1.5 MJ of gross energy/kg of metabolic BW, approximately 2.5 times maintenance energy requirements to gain a maximum of 250 g/d), the second group (restricted; **RES**) only received approximately 62.5% of MR intake as the AL group (approximately 1.5 times maintenance energy requirements to gain 100–120 g/d; NRC, 1985; Giráldez et al., 1999). The level of restriction was set according to previous studies carried out with milk-fed Assaf lambs (Manso et al., 1998; Castañares, 2008; Rodríguez et al., 2008). Ingredients and chemical composition of the MR administered are summarized in Table 1.

All the lambs were weighed twice a week throughout the artificial rearing period until they were 35 d old, when 8 representative animals from each group (16 lambs in total) were euthanized. Several pieces of liver were excised immediately, stabilized with RNAlater (Ambion Inc., Austin, TX) overnight at 4°C, and then stored at -80°C in order to study the liver transcriptomic and proteomic profiles. For this purpose, 4 liver samples from each group (8 lambs in total) were selected to cover the complete range of values of live BW at slaughter in each group and to avoid differences in birth weight between groups. Accumulated MR intake and animal performance of these preweaning lambs selected for omics (8 preweaning lambs in total) are summarized in Table 2 and Figure 1, whereas the rest of parameters measured at slaughter (16 preweaning lambs in total) are described in Santos et al. (2018c). The nonslaughtered animals (24 lambs in total) were weaned and fed ad libitum a TMR to study the effects of metabolic programming provoked by early feed restriction during the replacement phase (Frutos et al., 2018; Santos et al., 2018c). In the present study, only those data regarding liver transcriptomic and proteomic profiles of preweaning lamb (those slaughtered) are presented.

Transcriptomics Analysis of Liver Samples Using RNA Sequencing

A comparative liver transcriptome analysis was carried out using next-generation sequencing (RNA sequencing) as described in Santos et al. (2018c). Briefly, RNA extraction was performed in 4 liver samples per

Table 1. Ingredients and chemical composition (g/kg of DM, unless otherwise stated) of the commercial lamb milk replacer

Item	Value
Ingredient	
Skim milk powder	500
Milk whey powder	160
Vegetable oil (cocoa)	140
Animal fat (pork land)	120
Whey protein powder	40
Hydrolyzed wheat protein	15
Yeast/sodium bicarbonate/dextrose	15
PreVIT mineral ¹	10
Chemical composition	
DM, g/kg	960
CP	235
Ether extract	260
Ash	70
Metabolizable energy, kcal/kg of DM	5,089

¹Provided per kg of milk replacer: vitamin A, 80,000 IU; vitamin D₃, 4,250 IU; iron, 40 mg; cobalt, 0.2 mg; copper, 5 mg; manganese, 25 mg; zinc, 30 mg; selenium, 0.2 mg [Leches Maternizadas S.A. (LEMASA), León, Spain].

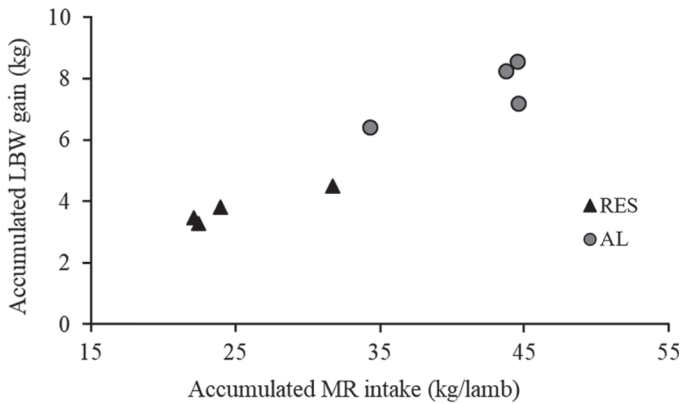


Figure 1. Accumulated live body weight (LBW) gain (kg) during the suckling period of lambs that were fed milk replacer (MR) ad libitum (AL) or restricted (RES).

group (8 samples in total), all of them presenting values for RNA integrity number larger than 8 (8.5 ± 0.04). The RNA sequencing (transcriptome sequencing) was then carried out on an Illumina HiSeq 2500 sequencer (Illumina, San Diego, CA). The sequence and annotation of the most recent ovine genome assembly was obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; accession number GCF_000298735.2, assembly Oar_v4.0).

A differential expression analysis was completed with the Bioconductor package DESeq2 (version 1.12.4; Love et al., 2014), whereas statistical analyses of differentially expressed genes were carried out using R (version 3.3.1; R Core Team, 2016). The data were deposited in the Gene Expression Omnibus database (GEO; accession number GSE110192; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Genes were considered to be differentially expressed if their *P*-value, adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method (false

discovery rate), was less than 0.05 (Benjamini and Hochberg, 1995). The DE gene list was interpreted through enrichment analysis [Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, version 6.8; <https://david.ncifcrf.gov/>) and kegg function (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) of the edgeR package (Robinson et al., 2010)].

Proteomic Analysis of Liver Samples

The procedure applied to study the liver proteome has been published previously in Santos et al. (2018d). Briefly, liver samples (4 animals per group, 8 samples in total) were homogenized, quantified for protein concentration with the Bradford assay (Bio-Rad Protein Assay, BioRad Laboratories, Hercules, CA), and stored at -80°C or applied directly to 18-cm immobilized pH gradient (IPG) strips (nonlinear gradient) before proteome resolution. Proteins were resolved in the first and second dimensions and then high-sensitivity colloidal Coomassie Blue G-250 Staining (blue silver, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) of all the two-dimensional gel electrophoresis was used for protein visualization (2 gels per sample, 8 gels per condition). Relative volume was calculated according to the volume of each spot divided by the total volume of all the spots in the gel. Differentially expressed proteins were considered when the ratio of the relative volume average between conditions was higher than 1.5 (fold change) and the *P*-value determined by Student's *t*-test was <0.05 . These proteins were selected for identification (4800 MALDI TOF/TOF Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA). Names of the proteins differentially accumulated in the liver were assigned according to GCF_000298735.2_Oar_v4.0. Identification of a certain protein was considered correct if the score was higher than 93 (protein score >93 ; $P < 0.05$).

Table 2. Effect of milk replacer restriction on animal performance of preweaning lambs [4 ad libitum (AL) vs. 4 restricted (RES) lambs]

Item	AL	RES	RSD ¹	<i>P</i> -value
Birth weight, kg	3.99	4.12	0.192	0.409
Suckling period, ² d	35.0	34.3	1.50	0.494
Accumulated milk replacer intake, kg	41.8	25.1	4.77	0.002
ADG, ³ g/d	199	99.8	14.59	<0.001
Slaughter weight, kg	11.6	7.90	0.739	<0.001
Hot carcass weight, kg	5.65	3.57	0.407	<0.001
Cold carcass weight, kg	5.44	3.40	0.396	<0.001
Omental fat, g	101	19.4	11.57	<0.001
Mesenteric fat, g	102	53.3	14.11	0.003
Perirenal fat, g	104	34.6	19.99	0.002

¹Residual standard deviation.

²Artificial rearing phase, from birth to slaughter.

³ADG during the suckling period.

RESULTS AND DISCUSSION

Several studies have demonstrated that postnatal feed restriction of lambs may induce early nutritional programming, thus affecting the metabolism, growth, development, feed efficiency, and health throughout life (Davies and Owen, 1967; Greenwood et al., 2004; Galvani et al., 2014; Santos et al., 2018a,b,c,d). However, in-depth understanding of the early physiological processes promoted by this postnatal feed restriction on preweaning lambs is lacking. We present a complete differential transcriptome and proteome analysis of liver samples corresponding to artificially reared Assaf lambs fed *MR ad libitum* or restricted during this phase of life.

Differential gene expression analysis in the hepatic tissue of suckling Assaf lambs identified 386 DE genes, 198 of them being annotated genes in the KEGG pathway. Positive values of \log_2 -fold change showed that 210 genes were upregulated in the RES relative to the AL group, whereas negative \log_2 -fold change values denoted the downregulation of 176 genes (Supplemental Table S1; <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15110>). The DAVID software and KEGG functional enrichment analysis identified functional gene clusters and pathways modified by milk replacer restriction, mainly related to the cytochrome P450, steroid hormone biosynthesis, AA metabolism, glycolysis/gluconeogenesis, and drug and xenobiotic metabolism. The most important terms and pathways are summarized in Tables 3 and 4.

The proteomic profile of the liver identified 26 differentially accumulated ($P < 0.05$) spots/proteins (Figure 2 and Table 5), 10 of them being down-accumulated whereas the other 16 evolved in the opposite way in the liver of RES lambs.

Carbohydrate Metabolic Pathways

After birth, animals have to be adapted to a new situation and emerging new metabolic pathways (Baldwin et al., 2004; Davis and Fiorotto, 2005; van den Borne et al., 2007). In this context, nutrient supply could modulate these adaptive changes, meaning suboptimal nutrition in the early life could promote long-term effects on health and feed efficiency with important economic implications during the postweaning phases (Santos et al., 2018a,b,c,d). For example, during the suckling period, gluconeogenesis is increased to maintain normoglycemia (Ferré et al., 1986; Girard, 1990) to the point that this metabolic route provides ~75% of the total glucose needs of neonatal ruminants (Nafikov and Beitz, 2007). However, in the present study, RES lambs were feed restricted, so a higher gluconeogenesis rate was expected in these animals to cover the glucose

requirements of the tissues. Accordingly, in the present study, the expression of some genes related to the glycolysis and gluconeogenesis (e.g., *GAPDH*, *PFKL*, *GPI*, and *ADH1C*) were upregulated, whereas that encoding glycogen synthase (e.g., *GYS2*, which is one of the main enzymes involved in the synthesis of glycogen) was downregulated in the RES lambs. These functional changes were corroborated by the proteomic profile of artificially reared lambs, where several proteins involved in glycolytic/gluconeogenic pathways (e.g., fructose-bisphosphate aldolase B and glyceraldehyde-3-phosphate DH) were differentially expressed in RES lambs (Table 5).

Likewise, it is interesting to note that *PDHA1* [pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1], which catalyzes the irreversible conversion of pyruvate into acetyl-CoA (Fu et al., 2017), was down-expressed in the RES lambs. This fact might have directed at least part of the intermediates of glycolysis toward biosynthetic pathways (e.g., pentose phosphate pathway) instead of tricarboxylic acid cycle (TAC; Salway, 2004). Accordingly, the expression of genes involved in TAC (e.g., *IDH2* and *OGDH*), oxidative phosphorylation (e.g., *ATP6V0E2* and *LOC101119721*), and energy metabolism (e.g., *CKMT2*) was affected in RES lambs, whereas the upregulation of cytoplasmic aconitate hydratase (an enzyme involved in TAC) might be explained by its moonlighting functions, as it is involved in iron homeostasis when cellular iron levels are low (such as occurs under feed restriction). All these changes are in accordance with the results obtained by Akbar et al. (2013) in feed-restricted dairy cows, who observed an increased expression of genes associated with gluconeogenesis and the inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation during mid-lactation.

Conversely, as mentioned previously, the pentose phosphate pathway seemed to be activated in the RES lambs (e.g., upregulation of *PRPS2*), thus producing NADPH to be used in the biosynthetic pathways prevalent in the growing lambs (Wood, 1985). Together with the increased expression of genes related to nucleotides (e.g., *XDH*, *LOC101109035*, *NT5E*, *AK7*, *LOC101106419*, *CMAS*, and *PRPS2*), components of the cell membranes such as glycerophospholipids (e.g., *PEMT*; Gimenez et al., 2011), nucleoporins involved in RNA transport (e.g., *NUP210*, *NUP62*, and *NDC1*), ribosome biogenesis (e.g., *POP7*, *LOC101102787*, *LOC101104725*, and *RPL22L1*), and the production of vitamins and cofactors (e.g., *TKFC*, *PNPO*, *NNT*, *BTD*, *SPR*, *LOC101103439*, *LOC101104703*, *DHRS3*, *LOC101119050*, and *BCO1*), these modifications seem to be indicative of an attempt of the growing organism for maintaining natural physiological functions for

Table 3. Annotation clusters identified by the functional annotation tool of DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) from the list of 386 differentially expressed genes [DESeq2; Love et al., 2014 (P . BH < 0.05¹)] in the livers of preweaning lambs fed milk replacer ad libitum (AL) or restricted (RES)

Term	No. ²	<i>P</i> -value
Annotation cluster 1 (enrichment score: 11.666)		
Steroid hormone biosynthesis	22	9.62E-18
Retinol metabolism	21	3.52E-17
Drug metabolism - cytochrome P450	19	1.86E-15
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	19	1.61E-14
Ascorbate and aldarate metabolism	12	2.84E-12
UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase	10	4.36E-12
Pentose and glucuronate interconversions	13	7.88E-12
Glucuronosyltransferase activity	10	4.99E-11
Drug metabolism - other enzymes	13	1.48E-10
Porphyrin and chlorophyll metabolism	13	1.48E-10
Metabolic process	14	1.76E-07
Glycosyltransferase	13	6.55E-07
Annotation cluster 2 (enrichment score: 6.521)		
Biosynthesis of amino acids	12	1.62E-06
Carbon metabolism	14	4.82E-06
Annotation cluster 3 (enrichment score: 3.605)		
NADP-dependent oxidoreductase domain	7	1.28E-06
Aldo/keto reductase subgroup	6	5.18E-06
Aldo/keto reductase	6	2.08E-05
Aldo/keto reductase, conserved site	5	9.49E-05
Aldo-keto reductase	6	1.18E-04
Oxidoreductase activity	10	1.78E-04
Ovarian steroidogenesis	4	1.53E-01
Arachidonic acid metabolism	4	3.42E-01
Annotation cluster 4 (enrichment score: 2.126)		
Iron	10	4.77E-04
Iron ion binding	10	1.75E-03
Heme binding	9	2.58E-03
Heme	7	3.44E-03
Cytochrome P450	5	1.61E-02
Monooxygenase	4	6.61E-02
Cytochrome P450, conserved site	3	1.67E-01
Annotation cluster 5 (enrichment score: 1.918)		
Pyridoxal phosphate-dependent transferase, major region, subdomain 2	5	6.63E-3
Pyridoxal phosphate-dependent transferase, major region, subdomain 1	5	9.45E-3
Pyridoxal phosphate-dependent transferase	5	9.45E-3
Pyridoxal phosphate binding	5	1.92E-2
Pyridoxal phosphate	4	2.25E-2
Annotation cluster 6 (enrichment score: 1.829)		
CO dehydrogenase flavoprotein-like, FAD-binding, subdomain 2	3	1.02E-2
Oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors	3	1.28E-2
FAD-binding, type 2	3	1.29E-2
Flavin adenine dinucleotide binding	5	2.88E-2
Annotation cluster 7 (enrichment score: 1.679)		
Carbohydrate kinase, FGGY, C-terminal	3	5.60E-3
Carbohydrate kinase, FGGY, N-terminal	3	7.74E-3
Keto-sugar kinase	3	1.40E-2
Carbohydrate metabolic process	4	3.17E-1

¹ P . BH < 0.05 = *P*-value, adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method (false discovery rate), was less than 0.05 (Benjamini and Hochberg, 1995).

²Number of genes involved in each term.

growth, such as cell proliferation, differentiation, and gene expression under feed restriction conditions.

Protein Metabolic Pathways

Keogh et al. (2016) demonstrated an increment of the expression of genes related to ribosomal functions (*RPL22*, *RPL23*, *RPL26*, *RP6S*, or *POP1*) that might

point towards enhanced protein biosynthesis in restricted-fed animals. This seems to be in agreement with the overaccumulation of glycine amidinotransferase (an intermediate of creatine) in the liver proteome of RES lambs as an attempt to increase muscle development under feed restriction conditions.

However, under feed restriction, protein accretion might be reduced by both a lack of nutrients and an

Table 4. Enriched Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) terms from the list of 386 differentially expressed genes [DESeq2 (Love et al., 2014; P . BH < 0.05¹)] in the livers of preweaning lambs fed milk replacer ad libitum (AL) or restricted (RES)

Enriched KEGG pathways	No. ²	P -value
Metabolic pathways	97	<0.001
Steroid hormone biosynthesis	24	<0.001
Retinol metabolism	22	<0.001
Drug metabolism, cytochrome P450	19	<0.001
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	19	<0.001
Ascorbate and aldarate metabolism	12	<0.001
Pentose and glucuronate interconversions	13	<0.001
Porphyrin and chlorophyll metabolism	13	<0.001
Drug metabolism, other enzymes	13	<0.001
Biosynthesis of AA	12	<0.001
Carbon metabolism	14	<0.001
Glutathione metabolism	8	<0.001
Glycine, serine and threonine metabolism	7	<0.001
Cysteine and methionine metabolism	7	<0.001
Arginine and proline metabolism	7	<0.001
Biosynthesis of UFA	5	<0.001
Fatty acid elongation	5	<0.001
Vitamin B ₆ metabolism	3	<0.001
2-Oxocarboxylic acid metabolism	4	<0.001
Fatty acid metabolism	6	0.001
Arginine biosynthesis	4	0.002
Alanine, aspartate, and glutamate metabolism	5	0.003
Tyrosine metabolism	5	0.003
Sulfur metabolism	3	0.003
Valine, leucine, and isoleucine biosynthesis	2	0.003
Peroxisome	7	0.004
Glycolysis/gluconeogenesis	6	0.005
Tryptophan metabolism	5	0.007
Fructose and mannose metabolism	4	0.008
Nitrogen metabolism	3	0.009
PPAR signaling pathway	6	0.009
Selenocompound metabolism	3	0.013
Ovarian steroidogenesis	5	0.017
Fatty acid degradation	4	0.020
Glycosaminoglycan biosynthesis, heparan sulfate/heparin	3	0.022
Phenylalanine metabolism	3	0.024
Arachidonic acid metabolism	6	0.027
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	4	0.034
Nicotinate and nicotinamide metabolism	3	0.035
Pentose phosphate pathway	3	0.038
Valine, leucine and isoleucine degradation	4	0.039
Starch and sucrose metabolism	3	0.045
Citrate cycle (tricarboxylic acid cycle)	3	0.052
Biotin metabolism	1	0.071
Purine metabolism	8	0.072
Lysine degradation	4	0.078
Cell cycle	6	0.094

¹ P . BH < 0.05 = P -value, adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method (false discovery rate), was less than 0.05 (Benjamini and Hochberg, 1995).

²Number of differentially expressed genes involved in the KEGG term.

increased catabolism of some AA to produce gluconeogenic precursors (James, 1972; Goodman et al., 1980; Dhahbi et al., 2001; Velez and Donkin, 2005). Accordingly, in the present study, the expression of genes involved in the catabolism of several AA (e.g., Ala, Cys, Met, Val, Leu, Ile, Tyr, and so on) was upregulated in the RES lambs. Nevertheless, those

involved in lysine degradation (e.g., *PLOD2*, *AASS*) were downregulated. Moreover, the down-expression of genes related to protein processing in endoplasmic reticulum (e.g., *TXNDC12*) might have increased terminally misfolded proteins directed toward degradation through the proteasome (Galligan and Petersen, 2012; Lee and Lee, 2017), which also presented genes modified by feed restriction (e.g., *PSMB9* and *PSMD6*). Consequently, the accumulation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum might have increased protein catabolism, thus causing stress and, hence, the apoptosis of cells (e.g., *PERP* was upregulated in RES lambs), as further explained below. All these results at transcriptome level match those observed in the liver proteome profile, where peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase A-like isoform X2 (involved in both protein folding and targeting for proteasomal degradation) and protein-disulfide isomerase (involved in protein folding) were up- and downregulated, respectively, in the liver of RES lambs. Moreover, several enzymes involved in AA degradation (e.g., 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial isoform X1, aminomethyltransferase, mitochondrial isoform X2) and protein catabolism (e.g., selenium-binding protein 1 isoform X1) were upregulated, whereas 2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase (involved in the isoleucine biosynthesis) was downregulated in the liver of RES lambs. It must be stressed that the expression of genes encoding enzymes involved in urea cycle (e.g., *CPS1*, *OAT*, and *ARG1*) was downregulated in the RES lambs, probably as a compensatory mechanism to favor nitrogen retention (James, 1972; Velez and Donkin, 2005). Therefore, the RES lambs might have increased the degradation of some AA to produce gluconeogenic precursors, but attempted to reduce time nitrogen losses at the same to maintain physiological normal growth under feed restriction conditions.

Lipid Metabolic Pathways

Feed restriction decreased the expression of genes related to the differentiation of adipocytes (e.g., *PLIN2*), synthesis of glycerolipids (e.g., *MOGAT1*), and long-chain fatty acids (e.g., *ELOVL4*, *ELOVL7*). This is in agreement with the down-expression of thiosulfate sulfurtransferase in the liver proteome of RES lambs, which is expressed selectively in adipocytes (Morton et al., 2016). Moreover, the expression of genes involved in the oxidation of a variety of organic substrates (e.g., *SORD*, *ADH1C*) and β -oxidation of fatty acids (e.g., *ECI1* and *ECHS1*) was increased in RES lambs. All these modifications at the transcriptome level might be related to functional changes [β -ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal isoform X2 (involved in β -oxidation

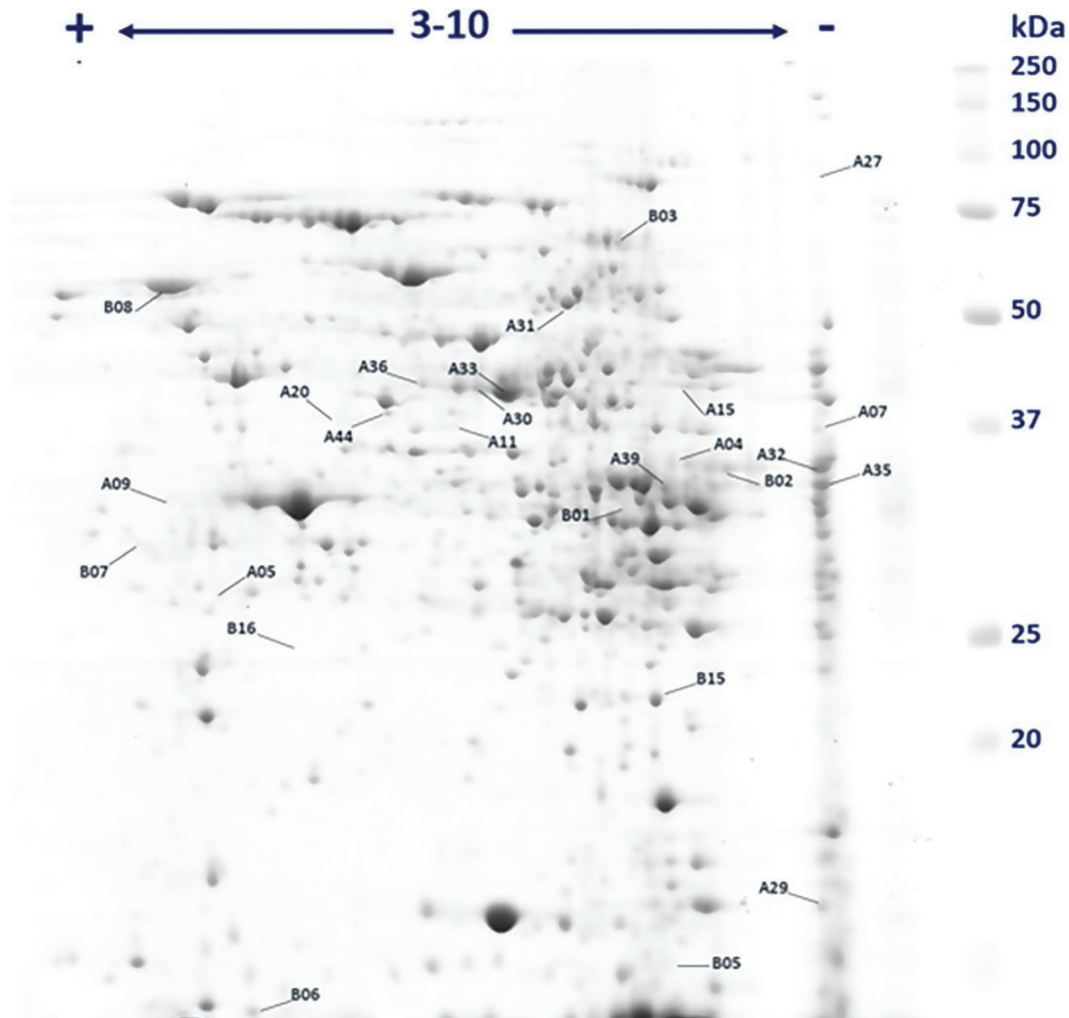


Figure 2. Representative colloidal Coomassie Blue (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) stained 2-dimensional electrophoresis gel of a liver from early milk restricted lambs. A total of 450 μ g of protein was loaded, and 2-dimensional gel electrophoresis was performed using a pH range of 3 to 10 in the first dimension and SDS-PAGE (12.5–15% total acrylamide) in the second dimension. Marked spot numbers refer to spot identification in Table 5. Twenty-four spots/proteins were identified using MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry analysis.

at peroxisomal level) was upregulated in the liver of RES lambs], which likely occur to render acetyl-CoA and glycerol (gluconeogenic precursor) through lipolysis and β -oxidation. In fact, Girard (1986) suggested that active hepatic fatty acid oxidation is necessary in the newborn to support hepatic gluconeogenesis by providing essential cofactors, such as acetyl CoA and NADPH.

Moreover, the hepatic fatty acid oxidation (coming either from the diet or fat depots) is fundamental to sustain protein accretion in growing lambs under feed restriction (Giráldez et al., 1999). However, fat mobilized from adipose tissue to liver for acetyl CoA production during feed restriction may cause hepatic steatosis (Xu et al., 2012; Santos et al., 2018b) and a concomitant increased expression of glucuronosyltransferases

(Yu et al., 2004; Xu et al., 2012). All these observations are in accordance with the results observed in our RES lambs (e.g., upregulation of *UGT1A6*, *UGT1A9*, *UGT2A1*, and *UGT2B7*) and may have implications in the conjugation reaction (via glucuronide) in phase II metabolism of drugs and xenobiotics. In addition, apart from the upregulation of *UGT* in the RES group, other genes related to the metabolism of drugs and xenobiotics were altered by early feed restriction. Thus, genes (e.g., *LOC101105651*, *LOC101112384*, and *EPHX1*) encoding phase I enzymes (i.e., oxidizing), belonging predominantly to the cytochrome P450 family (e.g., *CYP2C19*, *CYP2D14*), and others related to phase II (i.e., conjugation), such as glutathione transferases (e.g., *GSTA1-1*, and *GSTT2B*) and glycine N-acyltransferase (e.g., *LOC101108419* and *LOC101108685*), were over-

expressed in the RES lambs, which is in agreement with the results observed by Grubbs et al. (2013) in low-efficient pigs. However, protein synthesis could be repressed as a consequence of the lack of nutrients in the RES lambs (Yu et al., 2004; Xu et al., 2012), as previously stated.

Oxidative Stress and Cellular Damage Metabolic Pathways

Malnutrition provokes disorders in the peroxisomes, which are the organelles preventing the accumulation of steroid acids (van Zutphen et al., 2016). Accordingly, our results in the early feed-restricted group indicate the upregulation of many genes involved in metabolic pathways (e.g., steroid and steroid hormone biosynthesis, primary bile acid biosynthesis, and bile secretion). All these modifications might increase plasma levels of several cholesterol metabolites, such as oxysterols, bile alcohols, or bile acids, contributing to hepatic toxicity and damage (van Zutphen et al., 2016; Zhang et al.,

2016), thus inducing the production of reactive oxygen/nitrogen species and the initiation of apoptotic pathways (e.g., *PERP* is overexpressed in RES; Zhang et al., 2016). Therefore, in accordance with Grubbs et al. (2013), the increased expression of superoxide dismutase (e.g., *SOD1* and *LOC101115136*) and glutathione-S-transferase in the RES lambs (e.g., *MGST1*, which is involved in the production of inflammation mediators, such as leukotrienes or prostaglandin E) may indicate liver injury. Accordingly, recent studies have revealed that peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase A (which was overaccumulated in the liver of RES lambs) can be secreted by cells in response to inflammatory stimuli and oxidative stress (Jin et al., 2000, 2004; Nigro et al., 2013). In fact, these results corroborate the proinflammatory profile observed by metabolomics in the weaned lambs of the present experiment (nonslaughtered animals) during the replacement phase (Santos et al., 2018c). However, the apparently contradictory down-accumulation of mitochondrial superoxide dismutase in the liver proteome of RES lambs might have been

Table 5. List of spots/proteins identified by MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry analysis on the lamb liver 2-dimensional gel electrophoresis gel and differentially accumulated in the livers of preweaning lambs fed milk replacer ad libitum (AL) or restricted (RES)

Spot ¹	log ₂ FC ²	Protein name	Accession number ³	Theor. MW ⁴	Exp. MW ⁴	Theor. pI ⁵	Exp. pI ⁵
B15	-0.93	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	NP_001267632.1	24,580	23,658	8.89	7.89
A31	2.45	Selenium-binding protein 1 isoform X1	XP_012025411.1	52,516	52,466	6.33	6.38
B06	-2.17	2-Iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase	XP_004022295.1	14,327	14,000	7.82	5.29
B05	-2.05	2-Iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase	XP_004022295.1	14,327	15,426	7.82	7.02
A20	0.66	3-Hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial isoform X1	XP_011986429.1	40,110	37,845	5.83	5.54
A11	1.55	3-Hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial isoform X1	XP_011986429.1	40,110	37,437	5.83	5.80
A15	1.63	Aminomethyltransferase, mitochondrial isoform X2	XP_011977499.1	43,520	41,538	8.58	7.07
A29	4.99	Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase A-like isoform X2	XP_012010030.1	17,869	17,079	7.68	7.93
B08	-1.34	Protein-disulfide isomerase	XP_011964799.1	57,266	53,722	4.80	5.02
B02	-2.64	Fructose-bisphosphate aldolase B	XP_011966534.1	39,571	34,834	8.54	7.35
A32	1.83	Fructose-bisphosphate aldolase B	XP_011966534.1	39,571	34,657	8.54	7.95
A39	1.33	Glyceraldehyde-3-phosphate DH	NP_001177319.1	35,869	33,725	8.51	6.96
A35	2.31	Glyceraldehyde-3-phosphate DH	NP_001177319.1	35,868	33,852	8.51	7.95
B03	-1.71	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM1, mitochondrial isoform X1	XP_004020863.1	65,057	61,091	8.12	6.70
A07	2.81	3-Ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal isoform X2	XP_011995559.1	44,179	36,922	8.68	7.93
B01	-2.35	Thiosulfate sulfurtransferase	XP_012004218.1	33,277	32,757	7.06	6.71
A36	1.79	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	XP_004010698.1	48,494	41,713	8.00	5.77
A33	1.69	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	XP_004010698.1	48,494	40,995	8.00	6.01
A30	2.33	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	XP_004010698.1	48,494	41,527	8.00	5.93
A04	1.14	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	XP_012013381.1	48,357	34,904	8.00	7.00
A27	1.10	Cytoplasmic aconitate hydratase	XP_012005122.1	98,129	74,929	8.09	7.93
B16	-1.26	Plasminogen (fragment)	XP_011982598.1	9,397	25,657	7.10	5.39
A44	1.20	Uroporphyrinogen decarboxylase	NP_001012341.1	40,812	38,717	5.83	5.68
A05	1.48	LIM and SH3 domain protein 1	XP_004012879.1	29,677	27,980	6.61	5.20

¹Spots number labelled in Figure 2. Spots A09 and B07 were not included in Table 4 because they were not identified as *Ovis aries* proteins.

²Log₂ fold change of the relative volume average (positive value if RES/ADL >0.58; negative value if AL/RES >0.58).

³Accession number from NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

⁴MW = molecular weight (Dalton), theoretical (Theor.) and experimental (Exp.).

⁵pI = isoelectric point, theoretical (Theor.) and experimental (Exp.).

promoted by a reduced propagation of free radicals generated through oxidative phosphorylation because of the lower nutrient intake level (Sohal et al., 1994).

Other Metabolic Functions

Several other functions might have been affected by early feed restriction. It is noteworthy that *STS* was the only gene involved in the steroid hormone synthesis pathway that was down-expressed in the RES lambs. This gene has a crucial role in regulating the formation of biologically active sex steroids, such as estrogens (Reed et al., 2005); in fact, physiologically upregulated *STS* activity before puberty has been shown in humans (Idkowiak et al., 2016). In addition, it is interesting to note the downregulation of one of the genes (e.g., *SPR*) involved in the metabolic route related to folate biosynthesis; folate has been involved in epigenetic mechanisms (Crider et al., 2012), such as DNA methylation in the preovulatory oocyte or preimplantation embryo (Sinclair et al., 2007; Dupont et al., 2012). Consequently, the downregulation of both genes might be involved in the mechanisms that explain delays the onset of puberty after early feed restriction and impairment of reproductive functions in dairy ewes (Robinson et al., 2002, 2005). Accordingly, a delay in the onset of the first ovulation was observed in the replacement ewe lambs of the present study, as described previously in a different paper (Santos et al., 2018c).

Furthermore, Amadi et al. (2009) also described a reduced expression of heparan sulfate proteoglycan (*HSPG*) in enterocytes of children with Kwashiorkor that finally provoked intestinal protein loss and edema; in our study, genes involved in glycosaminoglycan biosynthesis and heparan sulfate (e.g., *GLCE* and *NDST3*) were down-expressed in RES lambs. Notwithstanding, the existence of differences in a specific tissue (e.g., liver) does not entail the same effect at other locations (Tiziotto et al., 2015).

CONCLUSIONS

According to the results obtained in the present study, early feed restriction during the artificial rearing period of Assaf lambs increases the oxidation of fatty acids and the hepatic oxidative stress, whereas protein synthesis and degradation were also modified to sustain gluconeogenic pathways. All these changes, together with the differential expression of genes involved in oxidative phosphorylation, may modify the partitioning and utilization of nutrients in early feed-restricted lambs.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO, AGL2014-54124R). Alba Santos gratefully acknowledges receipt of a predoctoral grant from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (MECD, FPU15/01630). The authors would like to thank David Kenny (TEAGASC, Animal & Grassland Research and Innovation Centre, Grange, Dunsany, Ireland) for his assistance with the English revision. We would also like to thank Instituto de Biotecnología de León (IN-BIOTEC), León, Spain, for the technical support with -omics. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Akbar, H., M. Bionaz, D. B. Carlson, S. L. Rodriguez-Zas, R. E. Everts, H. A. Lewin, J. K. Drackley, and J. J. Looor. 2013. Feed restriction, but not L-carnitine infusion, alters the liver transcriptome by inhibiting sterol synthesis and mitochondrial oxidative phosphorylation and increasing gluconeogenesis in mid-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:2201–2213. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6036>.
- Alexandre, P. A., L. J. A. Kogelman, M. H. A. Santana, D. Passarelli, L. H. Pulz, P. Fantinato-Neto, P. L. Silva, P. R. Leme, R. F. Strefezzi, L. L. Coutinho, J. B. S. Ferraz, J. P. Eler, H. N. Kadarmideen, and H. Fukumasu. 2015. Liver transcriptomic networks reveal main biological processes associated with feed efficiency in beef cattle. *BMC Genomics* 16:1073. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2292-8>.
- Altmann, S., E. Murani, M. Schwerin, C. C. Metges, K. Wimmers, and S. Ponsuksili. 2012. Maternal dietary protein restriction and excess affects offspring gene expression and methylation of non-SMC subunits of condensin I in liver and skeletal muscle. *Epigenetics* 7:239–252. <https://doi.org/10.4161/epi.7.3.19183>.
- Amadi, B., A. O. Fagbemi, P. Kelly, M. Mwiya, F. Torrente, C. Salvestrini, R. Day, M. H. Golden, E. A. Eklund, H. H. Freeze, and S. H. Murch. 2009. Reduced production of sulfated glycosaminoglycans occurs in Zambian children with kwashiorkor but not marasmus. *Am. J. Clin. Nutr.* 89:592–600. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27092>.
- Baldwin, R. L., K. R. McLeod, J. L. Klotz, and R. N. Heitman. 2004. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant. *J. Dairy Sci.* 87(E. Suppl.):E55–E65. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70061-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70061-2).
- Benjamini, Y., and Y. Hochberg. 1995. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* 57:289–300. <https://doi.org/10.2307/2346101>.
- Castañares, N. 2008. Recría de corderas de raza Assaf española. Efecto de la alimentación entre el nacimiento y los cinco meses de edad sobre el crecimiento de los animales, el desarrollo de la glándula mamaria y la producción de leche en la primera lactación. PhD Diss. Departamento de Producción Animal, Universidad de León, León, Spain.
- Crider, K. S., T. P. Yang, R. J. Berry, and L. B. Bailey. 2012. Folate and DNA methylation: A review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Adv. Nutr.* 3:21–38. <https://doi.org/10.3945/an.111.000992>.
- Davies, D. A. R., and J. B. Owen. 1967. The intensive rearing of lambs 1. Some factors affecting performance in the liquid feeding period. *Anim. Sci.* 9:501–508. <https://doi.org/10.1017/S0003356100042070>.

- Davis, T. A., and M. L. Fiorotto. 2005. Regulation of skeletal muscle protein metabolism in growing animals. Pages 35-68 in *Biology of Metabolism in Growing Animals*. Vol. 3. D. G. Burrin and H. J. Mersmann, ed. Elsevier, London, UK. [https://doi.org/10.1016/S1877-1823\(09\)70009-8](https://doi.org/10.1016/S1877-1823(09)70009-8).
- Dhabhi, J. M., P. L. Mote, J. Wingo, B. C. Rowley, S. X. Cao, R. L. Walford, and S. R. Spindler. 2001. Caloric restriction alters the feeding response of key metabolic enzyme genes. *Mech. Ageing Dev.* 122:1033-1048. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00230-5](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00230-5).
- Dupont, C., A. G. Cordier, C. Junien, B. Mandon-Pépin, R. Levy, and P. Chavatte-Palmer. 2012. Maternal environment and the reproductive function of the offspring. *Theriogenology* 78:1405-1414. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.016>.
- Ellis, P. J., T. J. Morris, B. M. Skinner, C. A. Sargent, M. H. Vickers, P. D. Gluckman, S. Gilmour, and N. A. Affara. 2014. Thrifty metabolic programming in rats is induced by both maternal undernutrition and postnatal leptin treatment, but masked in the presence of both: Implications for models of developmental programming. *BMC Genomics* 15:49. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-49>.
- Ferré, P., J. F. Decaux, T. Issad, and J. Girard. 1986. Changes in energy metabolism during the suckling and weaning period in the newborn. *Reprod. Nutr. Dev.* 26:619-631.
- Frutos, J., S. Andrés, E. Trevisi, J. Benavides, N. Santos, A. Santos, and F. J. Giráldez. 2018. Moderated milk replacer restriction of ewe lambs alters gut immunity parameters during the pre-weaning period and impairs liver function and animal performance during the replacement phase. *Anim. Feed Sci. Technol.* 243:80-89. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.07.009>.
- Fu, L., Y. Xu, Y. Hou, X. Qi, L. Zhou, H. Liu, Y. Luan, L. Jing, Y. Miao, S. Zhao, H. Liu, and X. Li. 2017. Proteomic analysis indicates that mitochondrial energy metabolism in skeletal muscle tissue is negatively correlated with feed efficiency in pigs. *Sci. Rep.* 7:45291. <https://doi.org/10.1038/srep45291>.
- Galligan, J. J., and D. R. Petersen. 2012. The human protein disulfide isomerase gene family. *Hum. Genomics* 6:6. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-6-6>.
- Galvani, D. B., C. C. Pires, C. H. Hübner, S. Carvalho, and T. P. Wommerd. 2014. Growth performance and carcass traits of early-weaned lambs as affected by the nutritional regimen of lactating ewes. *Small Rumin. Res.* 120:1-5. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.03.008>.
- Geraghty, A. A., K. L. Lindsay, G. Alberdi, F. M. McAuliffe, and E. R. Gibney. 2016. Nutrition during pregnancy impacts offspring's epigenetic status—Evidence from human and animal studies. *Nutr. Metab. Insights* 8(Suppl. 1):41-47. <https://doi.org/10.4137/NMI.S29527>.
- Gimenez, M. S., L. B. Oliveros, and N. N. Gomez. 2011. Nutritional deficiencies and phospholipid metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 12:2408-2433. <https://doi.org/10.3390/ijms12042408>.
- Giráldez, F. J., P. Frutos, P. Lavín, and A. R. Mantecón. 1999. Body composition changes and energy retention in milk-fed lambs undergoing energy restriction. *Small Rumin. Res.* 31:127-133. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(98\)00129-1](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(98)00129-1).
- Girard, J. 1986. Gluconeogenesis in late fetal and early neonatal life. *Biol. Neonate* 50:237-258. <https://doi.org/10.1159/000242605>.
- Girard, J. 1990. Metabolic adaptations to change of nutrition at birth. *Biol. Neonate* 58(Suppl. 1):3-15. <https://doi.org/10.1159/000243294>.
- González-Barranco, J., and J. M. Ríos-Torres. 2004. Early malnutrition and metabolic abnormalities later in life. *Nutr. Rev.* 62:S134-S139.
- Goodman, M. N., P. R. Larsen, M. M. Kaplan, T. T. Aoki, V. R. Young, and N. B. Ruderman. 1980. Starvation in the rat. II. Effect of age and obesity on protein sparing and fuel metabolism. *Am. J. Physiol.* 239:E277-E286. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1980.239.4.E277>.
- Greenwood, P. L., A. S. Hunt, and W. Bell. 2004. Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: IV. Organ growth. *J. Anim. Sci.* 82:422-428. <https://doi.org/10.2527/2004.822422x>.
- Grubbs, J. K., A. N. Fritchen, E. Huff-Lonergan, N. K. Gabler, and S. M. Lonergan. 2013. Selection for residual feed intake alters the mitochondria protein profile in pigs. *J. Proteomics* 80:334-345. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.01.017>.
- Istkowiak, J., A. E. Taylor, S. Subtil, D. M. O'Neil, R. Vijzelaar, R. P. Dias, R. Amin, T. G. Barrett, C. H. L. Shackleton, J. M. W. Kirk, C. Moss, and W. Arlt. 2016. Steroid sulfatase deficiency and androgen activation before and after puberty. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101:2545-2553. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-4101>.
- James, W. P. T. 1972. Protein synthesis and breakdown and amino acid catabolism in protein-calorie malnutrition. *Proc. Nutr. Soc.* 31:225-231.
- Jin, Z. G., A. O. Lungu, L. Xie, M. Wang, C. Wong, and B. C. Berk. 2004. Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:1186-1191. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000130664.51010.28>.
- Jin, Z. G., M. G. Melaragno, D. F. Liao, C. Yan, J. Haendeler, Y. A. Suh, J. D. Lambeth, and B. C. Berk. 2000. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ. Res.* 87:789-796. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.9.789>.
- Kang, W., M. S. Lee, and M. Baik. 2011. Dietary protein restriction alters lipid metabolism and insulin sensitivity in rats. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24:1274-1281. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10430>.
- Keogh, K., D. A. Kenny, P. Cormican, A. K. Kelly, and S. M. Waters. 2016. Effect of dietary restriction and subsequent re-alimentation on the transcriptional profile of hepatic tissue in cattle. *BMC Genomics* 17:244. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2578-5>.
- Khanal, P., and M. O. Nielsen. 2017. Impacts of prenatal nutrition on animal production and performance: a focus on growth and metabolic and endocrine function in sheep. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 8:75. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0205-1>.
- Lan, X., E. C. Cretney, J. Kropp, K. Khateeb, M. A. Berg, F. Peñagaricano, R. Magness, A. E. Radunz, and H. Khatib. 2013. Maternal diet during pregnancy induces gene expression and DNA methylation changes in fetal tissues in sheep. *Front. Genet.* 4:49. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00049>.
- Lee, E., and D. H. Lee. 2017. Emerging roles of protein disulfide isomerase in cancer. *BMB Rep.* 50:401-410. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.8.107>.
- Lillycrop, K. A., J. L. Slater-Jefferies, M. A. Hanson, K. M. Godfrey, A. A. Jackson, and G. C. Burdge. 2007. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. *Br. J. Nutr.* 97:1064-1073. <https://doi.org/10.1017/S000711450769196X>.
- Love, M. I., W. Huber, and S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15:550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- Manso, T., A. R. Mantecón, T. Castro, and G. R. Iason. 1998. Effect of intake level during milk-feeding period and protein content in the postweaning diet on performance and body composition in growing lambs. *Anim. Sci.* 67:513-521. <https://doi.org/10.1017/S135772980003294X>.
- Morton, N. M., J. Beltram, R. N. Carter, Z. Michailidou, G. Gorjanc, C. Mc Fadden, M. E. Barrios-Llerena, S. Rodriguez-Cuenca, M. T. G. Gibbins, R. E. Aird, J. M. Moreno-Navarrete, S. C. Munger, K. L. Svenson, A. Gastaldello, L. Ramage, G. Naredo, M. Zeyda, Z. V. Wang, A. F. Howie, A. Saari, P. Sipilä, T. M. Stulnig, V. Gudnason, C. J. Kenyon, J. R. Seckl, B. R. Walker, S. P. Webster, D. R. Dumbar, G. A. Churchill, A. Vidal-Puig, J. M. Fernández-Real, V. Emilsson, and S. Horvat. 2016. Genetic identification of thiosulfate sulfurtransferase as an adipocyte-expressed antidiabetic target in mice selected for leanness. *Nat. Med.* 22:771-779. <https://doi.org/10.1038/nm.4115>.
- Nafikov, R. A., and D. C. Beitz. 2007. Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals. *J. Nutr.* 137:702-705. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.702>.

- Nigro, P., G. Pompilio, and M. C. Capogrossi. 2013. Cyclophilin A: A key player for human disease. *Cell Death Dis.* 4:e888. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.410>.
- NRC. 1985. *Nutrient Requirements of Sheep*. 6th ed. Natl. Acad. Press, Washington DC.
- R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Reed, M. J., A. Purohit, L. W. Woo, S. P. Newman, and B. V. Potter. 2005. Steroid sulfatase: Molecular biology, regulation, and inhibition. *Endocr. Rev.* 26:171–202. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0003>.
- Robinson, J. J., C. J. Ashworth, J. A. Rooke, L. M. Mitchell, and T. G. McEvoy. 2005. Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126:259–276. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.006>.
- Robinson, M. D., D. J. McCarthy, and G. K. Smyth. 2010. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
- Robinson, J. J., J. A. Rooke, and T. G. McEvoy. 2002. Nutrition for conception and pregnancy. Pages 189–211 in *Sheep Nutrition*. M. Freer and H. Dove, ed. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Rodríguez, A. B., R. Landa, R. Bodas, N. Prieto, A. R. Mantecon, and F. J. Giraldez. 2008. Carcass and meat quality of Assaf milk fed lambs: Effect of rearing system and sex. *Meat Sci.* 80:225–230. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.11.023>.
- Roseboom, T. J., R. C. Painter, A. F. M. Van Abeelen, M. V. E. Veenendaal, and S. R. De Rooij. 2011. Hungry in the womb: What are the consequences? Lessons from the Dutch famine. *Maturitas* 70:141–145. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.06.017>.
- Ruchat, S.-M., L. Bouchard, and M.-F. Hivert. 2014. Early infant nutrition and metabolic programming: What are the potential molecular mechanisms? *Curr. Nutr. Rep.* 3:281–288. <https://doi.org/10.1007/s13668-014-0088-0>.
- Salway, J. G. 2004. *Metabolism at a Glance*. 3rd ed. Blackwell Publishing Ltd., Malden, MA.
- Santos, A., F. J. Giráldez, J. Mateo, J. Frutos, and S. Andrés. 2018a. Programming Merino lambs by early feed restriction reduces growth rates and increases fat accretion during the fattening period with no effect on meat quality traits. *Meat Sci.* 135:20–26. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.08.007>.
- Santos, A., F. J. Giráldez, E. Trevisi, L. Lucini, J. Frutos, and S. Andrés. 2018b. Liver transcriptomic and plasma metabolic profiles of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period. *J. Anim. Sci.* 96:1495–1507. <https://doi.org/10.1093/jas/sky029>.
- Santos, A., F. J. Giráldez, C. Valdés, E. Trevisi, L. Lucini, J. Frutos, and S. Andrés. 2018c. Milk replacer restriction during the early life impairs the live body weight and progesterone patterns of ewe lambs during the replacement period. *J. Dairy Sci.* 101:8021–8031. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14648>.
- Santos, A., C. Valdés, F. J. Giráldez, S. López, J. France, J. Frutos, M. Fernández, and S. Andrés. 2018d. Feed efficiency and the liver proteome of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period. *Animal* 12:1838–1846. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000046>.
- Sinclair, K. D., C. Allegrucci, R. Singh, D. S. Gardner, S. Sebastian, J. Bispham, A. Thurston, J. F. Huntley, W. D. Rees, C. A. Maloney, R. G. Lea, J. Craigon, T. G. McEvoy, and L. E. Young. 2007. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:19351–19356. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707258104>.
- Soberon, F., E. Raffrenato, R. W. Everett, and M. E. Van Amburgh. 2012. Preweaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 95:783–793. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4391>.
- Soberon, F., and M. E. Van Amburgh. 2013. Lactation biology symposium: The effect of nutrient intake from milk or milk replacer of preweaned dairy calves on lactation milk yield as adults: A meta-analysis of current data. *J. Anim. Sci.* 91:706–712. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5834>.
- Sohal, R. S., H.-H. Ku, S. Agarwal, M. J. Forster, and H. Lal. 1994. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* 74:121–133. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(94\)90104-X](https://doi.org/10.1016/0047-6374(94)90104-X).
- Tizioto, P. C., L. L. Coutinho, J. E. Decker, R. D. Schnabel, K. O. Rosa, P. S. N. Oliveira, M. M. Souza, G. B. Mourão, R. R. Tullio, A. S. Chaves, D. P. D. Lanna, A. Zerlotini-Neto, M. A. Mudadu, J. F. Taylor, and L. C. A. Regitano. 2015. Global liver gene expression differences in Nelore steers with divergent residual feed intake phenotypes. *BMC Genomics* 16:242. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1464-x>.
- van den Borne, J. J., G. E. Lobley, M. W. A. Verstegen, J. M. Muijlaert, S. J. J. Alferink, and W. J. J. Gerrits. 2007. Body fat deposition does not originate from carbohydrates in milk-fed calves. *J. Nutr.* 137:2234–2241. <https://doi.org/10.1093/jn/137.10.2234>.
- van Zutphen, T., J. Ciapaite, V. W. Bloks, C. Ackereley, A. Gerdling, A. Jurdzinski, R. A. de Moraes, L. Zhang, J. C. Wolters, R. Bischoff, R. J. Wanders, S. M. Houten, D. Bronte-Tinkew, T. Shatseva, G. F. Lewis, A. K. Groen, D. J. Reijngoud, B. M. Bakker, J. W. Jonker, P. K. Kim, and R. H. Bandsma. 2016. Malnutrition-associated liver steatosis and ATP depletion is caused by peroxisomal and mitochondrial dysfunction. *J. Hepatol.* 65:1198–1208. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.046>.
- Velez, J. C., and S. S. Donkin. 2005. Feed restriction induces pyruvate carboxylase but not phosphoenolpyruvate carboxykinase in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88:2938–2948. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72974-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72974-X).
- Vincent, A., I. Louveau, F. Gondret, C. Tréfeu, H. Gilbert, and L. Lefaucheur. 2015. Divergent selection for residual feed intake affects the transcriptomic and proteomic profiles of pig skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* 93:2745–2758. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-8928>.
- Wood, T. 1985. *The Pentose Phosphate Pathway*. Academic Press, Orlando, FL.
- Xu, J., S. R. Kulkarni, L. Li, and A. L. Slitt. 2012. UDP-glucuronosyltransferase expression in mouse liver is increased in obesity- and fasting-induced steatosis. *Drug Metab. Dispos.* 40:259–266. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.039925>.
- Yu, C., J. K. Ritter, R. J. Krieg, B. Rege, H. T. Karnes, and M. A. Sarkar. 2004. Effect of food restriction on UDP-glucuronosyltransferase (UGT) enzymes in liver. *Clin. Pharmacol. Ther.* 75:85. <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2003.11.326>.
- Zhang, L., W. Voskuil, M. Mouzaki, A. K. Groen, J. Alexander, C. Bourdon, A. Wang, C. J. Versloot, V. Di Giovanni, R. J. Wanders, and R. Bandsma. 2016. Impaired bile acid homeostasis in children with severe acute malnutrition. *PLoS One* 11:e0155143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155143>.

Capítulo V

Milk replacer restriction during early life impairs the live body weight and progesterone patterns of ewe lambs during the replacement period

Publicado en: Journal of Dairy Science



Milk replacer restriction during early life impairs the live body weight and progesterone patterns of ewe lambs during the replacement period

A. Santos,* F. J. Giráldez,* C. Valdés,* E. Trevisi,† L. Lucini,‡ J. Frutos,* and S. Andrés*¹

*Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), Finca Marzanas s/n, 24346, Grulleros, León, Spain

†Department of Animal Sciences, Food and Nutrition (DIANA), and

‡Department for Sustainable Food Process, Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Emilia Parmense 84, 29122, Piacenza, Italy

ABSTRACT

Nutritional programming caused by feed restriction during the early life may counteract the profitability of the dairy sheep farm. However, most studies have been focused exclusively on the prenatal period, and scarce information regarding the effect of milk replacer (MR) restriction on feed efficiency [residual feed intake (RFI)] and progesterone patterns of replacement ewe lambs is available. Therefore, in the present study 40 Assaf female newborn lambs were penned individually and assigned randomly to 1 of 2 treatment groups ($n = 20$ per treatment). The first group of lambs was fed MR ad libitum (ADLB), whereas the second one (restricted, RES) only received approximately 62.5% of the MR intake measured in the ADLB group. All the lambs were weighed twice a week until they were 35 d old. Then 8 lambs from each group were killed and a morphological study of the gut was performed. Moreover, a piece of liver was cut to measure fat content and oxidative status. The rest of the ewe lambs (24) were weaned and offered a total mixed ration ad libitum to calculate the RFI during the replacement phase. Plasma samples were collected when ewe lambs were 8 mo old to perform a nontargeted metabolomic analysis on a hybrid quadrupole-time-of-flight mass spectrometer coupled to an ultra-high-performance liquid chromatographic system. Progesterone was also measured weekly on serum samples by sequential competitive immunoassay until the end of the experiment (9.5 mo old). The results observed indicate that moderated MR restriction promoted differences in the morphology of the gut of the 35-d-old lambs, but not in the apparent digestibility or feed efficiency traits (RFI) during the replacement phase. However, there was a trend toward reduced live body weight of the RES ewe lambs when they were 9.5

mo old. Moreover, progesterone patterns revealed that only 1 RES versus 4 ADLB ewe lambs had ovulated for the first time at the end of the experiment. This evidence suggests the existence of long-term effects caused by early feed restriction with negative consequences on live body weight and reproductive traits of replacement ewe lambs.

Key words: feed efficiency, puberty, nutritional programming, metabolome

INTRODUCTION

Insufficient nutrient supply to replacement ewe lambs during the first weeks of life may counteract the flock output and profitability of the dairy sheep farm as a consequence of the early nutritional programming caused by early feed restriction (Robinson, 1996). In fact, the development of the mammary parenchymal mass in calves is affected by the feeding level during the first weeks of life (Kaske et al., 2010) and hence the milk yield mainly during the first lactation (Drackley et al., 2007). Moreover, previous studies in fattening lambs have demonstrated that early feed restriction enhances fat accretion, thus impairing feed efficiency (FE) and increasing feeding costs to reach a similar target BW at slaughter (Santos et al., 2018a,b,c). However, there is a lack of studies describing the effects of early feed restriction on replacement ewe lambs, a circumstance that might take place when environmental, health, and feeding conditions are not optimal.

In this sense, a very widespread measure of FE is residual feed intake (RFI), which is defined as the difference between an animal's actual feed intake and its expected feed intake based on its size and growth (Koch et al., 1963). It is independent of the level of production, and the lower the value the more efficient the animal is. Residual feed intake has been described to be negatively influenced by several factors such as genetic traits, nutrition of the pregnant dam, and early postnatal nutrition (Gotoh, 2015; Bell and Greenwood, 2016). Nevertheless, divergent results can be observed

Received February 26, 2018.

Accepted May 16, 2018.

¹ Corresponding author: sonia.andres@eae.csic.es

attending to different levels or periods of restriction or realimentation, diet types administered during the refeeding period (more or less energetic), or the characteristics (age or sex) of the animals studied (Neto et al., 2011). Furthermore, the length of the unproductive replacement phase before the ewe lambs reach sexual maturity can be extended in early-feed-restricted animals (Chilliard et al., 1998; Robinson et al., 2002, 2005), but the mechanisms explaining the residual effects after a long refeeding period are largely unknown. Therefore, studies describing the effects of milk replacer (**MR**) restriction on replacement ewe lambs are required to adequately evaluate the effects on animal performance and reproductive traits. These studies should include -omic tools to better understand the metabolic pathways impaired by feed restriction (Carrillo et al., 2016; Santos et al., 2018c), thus helping to identify potential strategies to correct detrimental effects during the replacement period.

The purpose of this experiment was to determine the effect of MR restriction of replacement ewe lambs on both FE traits and progesterone patterns during the replacement period to establish if the RFI or reproductive traits are negatively affected (or not) according to this factor. A metabolomic approach has been used to better understand the biochemical mechanisms under the observed effects.

MATERIALS AND METHODS

Care and Use of Animals

All handling practices involving animals followed the recommendations of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes and the Instituto de Ganadería de Montaña, Animal Experimentation Committee (protocol number 2015–04).

Animals and Diets

A flock of newborn Assaf lambs was separated from their dams just after parturition. The dams were hand-milked and the colostrum offered by bottle-feeding for 2 d. Lambs were bottle-fed for another 2 d with commercial MR (Cordevit, Leches Maternizadas S.A., León, Spain). All newborn lambs were treated with an intramuscular injectable selenium + vitamin E complex at the prescribed dose (Vitasel: 5 g of α -tocopherol acetate, 110 mg of sodium selenite, excipient, per 100 mL; Laboratorios Ovejero, León, Spain) to prevent nutritional muscular dystrophy (white muscle disease). Thereafter, 40 female lambs were selected from the

Table 1. Ingredients and chemical composition of the commercial lamb milk replacer administered during the artificial rearing period of the lambs

Item	Value
Ingredient (g/kg)	
Skim milk powder	500
Milk whey powder	160
Vegetable oil (cocoa)	140
Animal fat (pork lard)	120
Whey protein powder	40
Hydrolyzed wheat protein	15
Yeast/sodium bicarbonate/dextrose	15
PreVIT mineral ¹	10
Chemical composition (g/kg of DM)	
DM (g/kg)	960
CP	235
Ether extract	260
Ash	70
ME (kcal/kg of DM)	5,089

¹Provided per kilogram of milk replacer: vitamin A, 80,000 IU; vitamin D₃, 4,250 IU; iron, 40 mg; cobalt, 0.2 mg; copper, 5 mg; manganese, 25 mg; zinc, 30 mg; selenium, 0.2 mg (Leches Maternizadas S.A., León, Spain).

flock to minimize the range of both, live body weight (**LBW**), and day of birth. Subsequently, all the lambs were penned individually and allocated randomly to 1 of 2 treatment groups (n = 20 per treatment). All the lambs were fed MR 3 times daily (0830, 1400, and 2030 h) during the first week, and only twice daily (0830 and 1930 h) during the rest of the suckling period. However, whereas the first group of lambs was fed MR ad libitum (**ADLB**, approximately 2.5 times maintenance energy requirements to gain 250 g/d), the second one (restricted, **RES**) only received approximately 62.5% of MR intake measured in the ADLB group (approximately 1.5 times maintenance energy requirements to gain 100–120 g/d; NRC, 1985; Giráldez et al., 1999). Ingredients and chemical composition of the MR administered are summarized in Table 1.

All the female lambs were weighed twice a week throughout the suckling period and once a week after being weaned. When lambs were 35 d old, 8 lambs from each group (16 lambs in total) were stunned, killed by exsanguination from the jugular vein, eviscerated, and skinned according to the Council Regulation (EC) N° 1099/2009 on the protection of animals at the time of killing. A piece of liver was cut and kept at –80°C until fat content (AOAC International, 2003) and thiobarbituric acid reactive substances (**TBARS**, an indicator of oxidative stress) were measured (Bodas et al., 2012). Moreover, a piece of ileum from each animal 20 cm from the pylorus was placed in a 10% formaldehyde solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and used to measure the villus height according to Makovicky et al. (2014).

The rest of the ADLB ewe lambs ($n = 12$) were weaned progressively starting at a mean LBW of 13.5 kg (ADLB), whereas the RES ewe lambs ($n = 12$) started weaning either at 11.5 kg or 70 d old to ensure the viability of these animals. The progressive weaning lasted 1 wk and consisted of restricting MR intake and allowing free access to a starter feed for replacement lambs (Babymix, Inatega, Spain), barley straw, and alfalfa hay. Once the animals were weaned they were moved to a single feedlot where they stayed during 42 d (first postweaning period), being fed ad libitum the same starter feed, barley straw, and alfalfa hay supplied in separate feeders. After this period, the ewe lambs were fed ad libitum a TMR (CP: 128 g/kg of DM; ME: 2,303 kcal/kg of DM; NRC, 1985) in the feedlot until they were 7.5 mo old (end of the second postweaning period). Then, the ewe lambs were individually penned during 8 wk (third postweaning period) trying to reach a balance between scientific purposes and welfare considerations. During this last phase the intake of TMR was measured individually to obtain data to estimate the RFI. Ingredients and chemical composition of the TMR administered are summarized in Table 2.

Animals were allowed 7 d of adaptation to individual pens, which were equipped with an automatic drinker to provide fresh drinking water. All the ewe lambs received ad libitum the experimental TMR at 0900 h daily. The amount of feed offered to each ewe lamb was adjusted daily according to the previous day's intake to allow refusals of approximately 200 g/kg of feed offered. Samples of both the feed offered and refusals were collected daily for subsequent analyses of DM content

after mixing all the subsamples refused by each animal during one week. Samples of the TMR offered were collected weekly and analyzed for DM (ISO, 1999), ash (ISO, 2002), CP (ISO, 2005), amylase-treated NDF (NDF was assayed with a heat-stable amylase and expressed inclusive of residual ash; Ankom Technology Corp., Macedon, NY), and ADF (ADF was expressed inclusive of residual ash; Ankom Technology Corp.).

Animal Performance, Digestibility, and Blood Sampling

Average daily gain (g/d) was estimated as the regression coefficient (slope) of LBW against time using the REG procedure of the SAS package (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC). The feed conversion ratio was obtained by dividing the feed intake per day by the ADG (g/d). Residual feed intake was calculated using a multiple linear regression model, into which the DMI, ADG, and mid-test metabolic body weight (MBW, as $LBW^{0.75}$) data of all the lambs were introduced. The statistical model used was

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 MBW_i + \beta_2 ADG_i + e_i,$$

where Y_i represents the predicted DMI of the i th animal; β_0 is the equation intercept; β_1 is the regression coefficient on MBW; β_2 is the regression coefficient on ADG; and e_i is the residual of the i th animal. Then, this prediction may be thought of as the average or expected value for animals of similar weights and rates of gain. The actual daily feed intake minus the predicted feed intake of each individual corresponds to the RFI.

Digestibility was determined using acid insoluble ash as an internal marker. Feed and feces were sampled for 9 d during the third postweaning period once the animals were completely adapted to being fed the TMR. Samples of offered and refused feed were taken daily from d 1 to 7 of the collection period; daily rectal grab samples were collected once a day before the morning meal for the last 7 d of the collection period. Samples of both feed and feces of each animal were weighed and pooled to form composite samples and stored at -30°C until acid insoluble ash analysis (Van Keulen and Young, 1977).

The nonslaughtered 24 animals (12 animals per group) were blood sampled for metabolomics analysis early in the morning before TMR distribution when lambs were 8 mo old by jugular venipuncture into tubes containing lithium-heparin, placed in iced water, and centrifuged at $3,520 \times g$ for 16 min at 5°C . Then, plasma samples were stored at -80°C until metabolome analyses. Moreover, blood samples were collected

Table 2. Ingredients (Inatega, León, Spain) and chemical composition of the TMR administered to the replacement ewe lambs

Item	Value
Ingredient (g/kg)	
Barley	360
Lucerne	160
Barley straw	157
Vetch	133
Molasses (sugar cane)	50
Corn	50
Sunflower	43
Soybean meal 44	30
Vitamins and minerals	17
Chemical composition, (g/kg of DM unless otherwise indicated)	
DM (g/kg)	892
aNDF ¹	355
ADF	215
CP	128
Ash	75.4
ME (kcal/kg of DM)	2,303

¹Amylase-treated neutral detergent fiber.

weekly into tubes containing no anticoagulant. Tubes with no anticoagulant were allowed to clot in a water bath at 37°C for 30 min and then centrifuged at $3,520 \times g$ for 16 min at 4°C. Thereafter, serum samples obtained were stored at -80°C until used to measure progesterone concentration. Ovulation was monitored via progesterone assay of weekly blood samples beginning with 4 mo of life until the end of the experiment (9.5 mo old). The measurements were performed on serum by sequential competitive immunoassay (Immulate/Immulate 1000 Progesterone, Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY).

Metabolomic Profile of Plasma

A mass spectrometric metabolomics approach was used to profile chemical compounds in plasma samples. Aliquots of each sample (150 μ L) were diluted in 10 volumes of acetonitrile/methanol/trichloroacetic acid mixture (50:47:3 vol/vol, liquid chromatography/mass spectrometry grade from VWR, Milan, Italy), vortex mixed, and then left at -18°C overnight for protein precipitation. Extracts were then centrifuged ($8,000 \times g$) at 4°C and the supernatant was filtered through a 0.2- μ m cellulose syringe filter. Analysis of purified extracts was next carried out using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to a hybrid quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (UHPLC/QTOF-MS). In more detail, an Agilent 1290 liquid chromatograph system equipped with binary pump and a Dual Electropray Jet Stream ionization system, and an Agilent G6550 mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), were used.

The UHPLC/QTOF-MS metabolomic analysis was carried out as set out in previous experiments (Rouphael et al., 2016). Briefly, compounds were chromatographically resolved on an Agilent Zorbax Eclipse-plus column (75 \times 2.1 mm i.d., 1.8 μ m) using a gradient made with 5% B and increased to 90% B within 35 min. Mobile phase consisted of water (A) and methanol (B), flowing at 220 μ L/min and 35°C, whereas the mass spectrometer was run in positive polarity and scan mode (range of 100–1,200 m/z), using a nominal mass resolution of 30,000 full width at half maximum. Electrospray ionization source was set with a capillary voltage of 4 kV, a nebulizer pressure of 515,010.4 Pa, and a drying gas (nitrogen) at 280°C (Cardarelli et al., 2013).

Postacquisition processing and annotation were done in Profinder B.06 (Agilent Technologies). Compound identification was carried out using accurate masses together with the whole isotopic pattern (i.e., isotope accurate spacing and isotope ratio), following initial

deconvolution as well as mass and retention time alignment. Therefore, identification was carried out as level 2 (putatively annotated compounds), according to COSMOS Metabolomics Standards Initiative (<http://cosmos-fp7.eu/msi>). The commercially available database Metlin (Agilent Technologies) was used for annotation of compounds. A filter by frequency (retaining those compounds that were present in 75% of replications within at least one treatment) and by abundance (area >10,000 counts) was finally applied in Mass Profiler Professional B.12.06 (Agilent Technologies).

Statistical Analysis

Data corresponding to the preweaned slaughtered lambs (organs and noncarcass parts, villus height, liver fat, and TBARS values), together with those related to replacement ewe lamb performance (ADG, RFI, and digestibility) of the nonslaughtered animals, were analyzed by 1-way ANOVA using the GLM procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) with the dietary treatment (ad libitum or restricted during early life) as the only source of variation. In all cases, the individual lamb was considered as the experimental unit. Significance was declared at $P < 0.05$.

Metabolomics data were formerly elaborated using Agilent Mass Profiler Professional B.12.06. Compound abundances were normalized at the 75th percentile and the baseline was set to the median of ADLB animals. Unsupervised hierarchical cluster analysis was carried out setting the similarity measure of Euclidean and Wards as linkage rule. The data set was then exported into SIMCA 13 (Umetrics, Malmo, Sweden), pareto-scaled, and elaborated for orthogonal projections to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) supervised modeling. Herein, OPLS-DA allowed separating variation between the groups into predictive and orthogonal (i.e., ascribable to technical and biological variation) components. Outliers were excluded using the distance from the origin in the OPLS-DA model, according to Hotelling's T² and adopting 95 and 99% confidence limits for suspect and strong outliers, respectively. Model overfitting was excluded through permutation testing. Model parameters (goodness-of-fit R²Y and goodness-of-prediction Q²Y) were also produced. Regarding Q²Y prediction ability, a value >0.5 was adopted as a threshold to identify acceptable models, according to software recommendation and as set out in literature (Rombouts et al., 2017). Variable importance in projection (VIP) analysis was used to evaluate the importance of metabolites and to select those having the highest discrimination potential (VIP score >1.3). The metabolites highlighted by VIP analy-

Table 3. Effect of milk replacer restriction during the artificial rearing phase (ad libitum, ADLB, vs. restricted, RES) on visceral organ weights (g), fat depots (g), ileum villi height (μm), and liver thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) values of preweaned lambs (8 ADLB vs. 8 RES lambs)

Item	ADLB	RES	RSD ¹	P-value
Birth LBW ² (kg)	3.94	4.21	0.318	0.111
Slaughter LBW (kg)	11.1	8.06	1.09	<0.001
Empty live weight (ELW; kg)	10.3	7.19	1.00	<0.001
Total fat depots (TFD; % of ELW)	2.81	1.54	0.405	<0.001
Omental fat (% TFD)	33.5	18.6	5.09	<0.001
Mesenteric fat (% of TFD)	33.3	51.5	8.61	<0.001
Perirenal fat (% of TFD)	33.2	29.9	8.50	0.449
Blood (% of ELW)	4.25	4.42	0.576	0.563
Liver (% of ELW)	2.26	2.13	0.289	0.403
Respiratory tract ³ (% of ELW)	2.56	2.54	0.196	0.866
Heart (% ELW)	0.744	0.742	0.1265	0.971
Spleen (% ELW)	0.336	0.262	0.1066	0.186
Empty digestive tract ⁴ (EDT; % of ELW)	9.20	9.15	0.783	0.897
Reticulorumen (% of EDT)	9.13	11.6	2.013	0.026
Omasum (% of EDT)	1.20	2.02	1.320	0.237
Abomasum (% of EDT)	6.92	8.32	1.445	0.071
Small intestine (% of EDT)	45.1	46.9	4.46	0.436
Large intestine (% of EDT)	17.3	19.5	3.24	0.191
Liver fat (g/kg of DM)	3.37	2.99	0.525	0.204
Ileum villi height (μm)	523	472	53.6	0.085
Liver TBARS (μg of MDA ⁵ /g of sample)	2.63	2.22	0.916	0.387

¹Residual standard deviation.²LBW = live body weight.³Sum of pharynx, trachea, and lungs.⁴Sum of rumen, omasum, abomasum, small intestine, large intestine, mesenteric, and omental fat.⁵MDA = malondialdehyde.

sis were finally analyzed into Mass Profiler Professional for fold-change analysis.

RESULTS

Visceral Organ Weight, Fat Depots, Histological Structure of Intestinal Mucosa, and Liver Parameters of Preweaned Lambs

Table 3 summarizes all of the parameters measured in the 35-d-old lambs slaughtered during the MR restriction period. As expected, the RES lambs were slaughtered with a lower LBW (11.1 vs. 8.06 kg for ADLB and RES lambs, respectively; $P < 0.001$). Consequently, to obtain information about body development regardless of the LBW at slaughter, we decided to express all the weights as percentage of empty live weight, percentage of the empty digestive tract (EDT), or percentage of total fat depots. According to our results, only those parameters related to the development of several part of the gastrointestinal tract were affected by early feed restriction. Thus, although the weights of the reticulorumen and abomasum were reduced for the RES lambs ($P < 0.001$, data not shown), the proportion of these parts of the gut was increased when calculated as percentage of the EDT. In addition,

average villus height was greater ($P < 0.05$) in ileal epithelium of ADLB compared with RES lambs (523 vs. 472 μm , Table 3). Moreover, the proportion of omental fat (expressed as percentage of total fat depots) was significantly reduced in the RES lambs, whereas an opposite effect was observed for the mesenteric fat weight. No differences in liver fat or liver antioxidant status (TBARS) were observed between both groups of lambs ($P > 0.05$).

Animal Performance of Replacement Ewe Lambs

Animal performance data can be found in Table 4. As expected, ADG during the suckling period was reduced for the RES ewe lambs (116 vs. 237 g/d, $P < 0.001$), so the age at weaning was delayed slightly to avoid hampering the viability of this group of animals. Once weaned, the ADG during the first postweaning period was higher for the RES lambs (274 vs. 238 g/d, $P = 0.029$) while they were being fed the starter feed together with alfalfa hay and barley straw. Thereafter, once the replacement ewe lambs were being fed the TMR, RES ewe lambs showed reduced ADG ($P < 0.05$) in the second postweaning period. No differences in the RFI, feed-to-gain ratio, or digestibility parameters ($P > 0.05$) were detected during this third postweaning

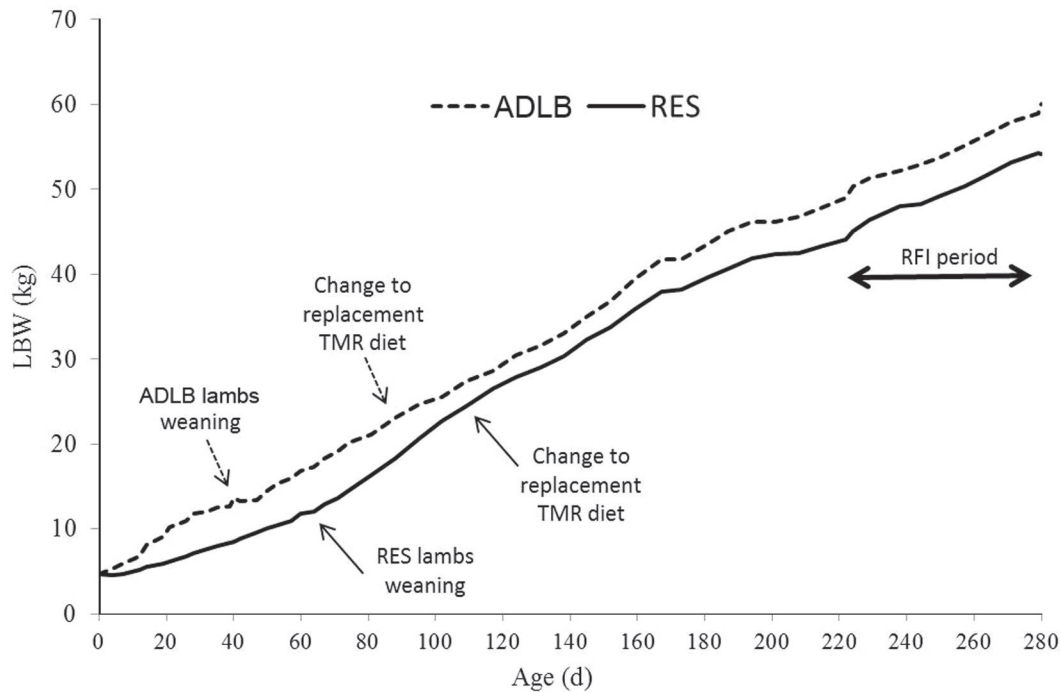


Figure 1. Change of live body weight (LBW, kg) throughout the experiment of replacement ewe lambs that received ad libitum (ADLB) or restricted (RES) feed during the artificial rearing phase. RFI = residual feed intake.

Table 4. Effect of milk replacer restriction during the artificial rearing phase (ad libitum, ADLB, vs. restricted, RES) on pre- and postweaning growth performance of replacement ewe lambs (12 ADLB vs. 12 RES lambs)

Item	ADLB	RES	RSD ¹	<i>P</i> -value
Birth LBW ² (kg)	4.69	4.72	0.531	0.894
Suckling period				
ADG suckling period (g/d)	237	116	48.9	<0.001
LBW at beginning of weaning (kg)	13.7	11.2	0.62	0.002
LBW at weaning (kg)	13.4	12.1	0.43	0.002
Age at weaning (d)	47	65	10.6	<0.001
First postweaning period				
ADG first PW ³ period (g/d)	238	274	38.6	0.029
Age at the end of first PW period (d)	89	107	10.7	<0.001
LBW at the end of first PW period (kg)	23.4	23.8	1.58	0.612
Second postweaning period				
ADG at second PW period (g/d)	202	182	21.1	0.049
Age at the end of second PW period (d)	224	224	2.8	0.666
LBW at the end of second PW period (kg)	50.4	45.1	7.62	0.101
Third postweaning period (RFI estimation)				
ADG at third PW period (g/d)	178	158	32.3	0.146
Age at the end of third PW period (d)	280	280	2.8	0.666
LBW at the end of third PW period (kg)	60.1	54.1	7.87	0.087
DMI third PW period (g of DM/animal per d)	1,779	1,652	243.2	0.212
RFI ⁴ (g of DM/animal per d)	-2.02	0.603	143.4	0.968
Feed-to-gain ratio (g of DMI/g of ADG)	10.1	10.4	1.46	0.897
DM digestibility (%)	67.4	66.5	4.83	0.669
OM digestibility (%)	69.4	68.6	4.69	0.699

¹Residual standard deviation.

²LBW = live body weight.

³PW = postweaning.

⁴Residual feed intake (RFI) calculated using ADG estimated by regression.

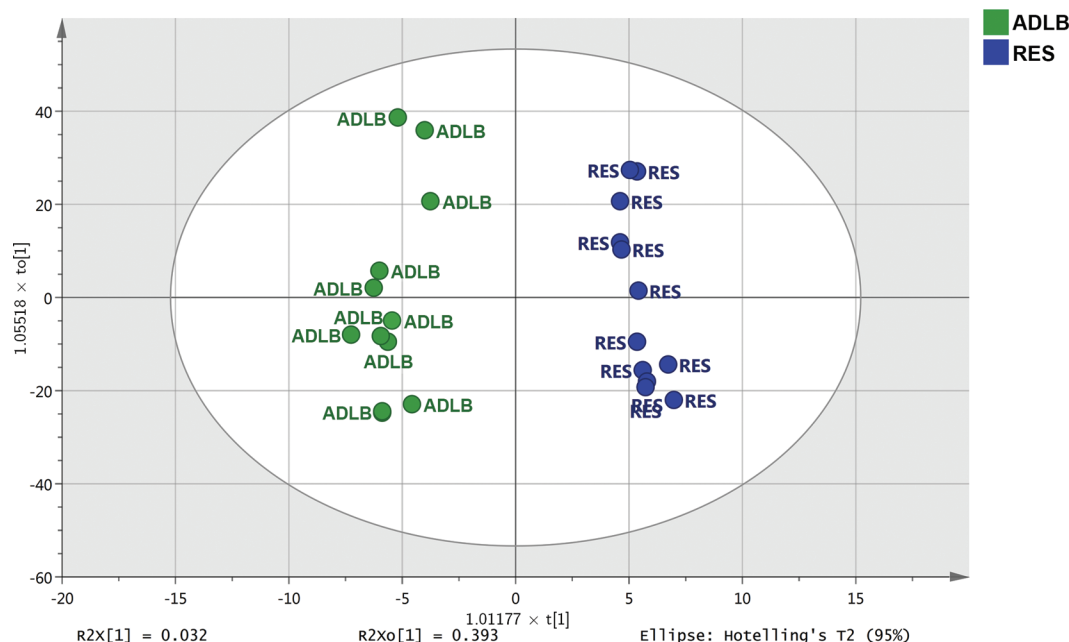


Figure 2. Plasma samples from replacement ewe lambs that received ad libitum (ADLB) or restricted (RES) feed during the artificial rearing phase, analyzed for metabolomic profile and distributed in the score plot according to the first 2 components of the model (i.e., t_0 and t_1 , these items being preceded by values scaling each component proportionally to the percentage of variance explained). $R^2X[1]$ and $R^2Xo[1]$ represent the variation explained by each component (nonorthogonal and orthogonal component, respectively). Results were produced by the software SIMCA 13 (Umetrics, Malo, Sweden). Color version available online.

period, but a trend ($P = 0.087$) was observed toward reduced LBW (kg) at the end of the experiment for the RES ewe lambs (Figure 1).

Metabolomic Profile

With regard to the metabolomic profile obtained when the ewe lambs were 8 mo old, this procedure successfully classified the plasma samples into 2 different clusters related to the experimental treatments (ADLB and RES, Figure 2). The OPLS-DA supervised approach allowed to effectively separate the 2 treatments, resulting in a goodness-of-fit R^2Y of 0.84 and a prediction ability Q^2Y of 0.55. The model was validated by cross-validated ANOVA and resulted in a 100% classification after misclassification test. Hotelling's T^2 , carried out at both 95 and 99% (suspect and strong outliers, respectively), excluded the presence of outlier samples. Given the validity of the supervised model, VIP analysis allowed to point out differential metabolites. These latter were finally subjected to fold-change analysis; these compounds, together with their trend in RES versus ADLB treatments, are provided in Table 5. In total, 129 metabolites with a VIP score >1.3 were detected, 48 of them being identified with the database used. From this set of compounds, 42 metabolites were over-accumulated and 6 down-accumulated in the RES

when compared with the ADLB lambs. Most of the metabolites over-accumulated in the RES group were related to lipids such as diacylglycerophosphoinositols [e.g., PI (15:0/14:0)], diacylglyceropyrophosphates [e.g., PPA [16:0/18:1(9Z)]], or diacylglycerophosphates [e.g., PA [20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/21:0]], but also to protein metabolism (e.g., 2-oxoarginine, Ne-methyl-L-lysine, Thr Phe Arg), xenobiotics (e.g., vomicine), inflammation [e.g., prostaglandin E_2 (PGE_2)-biotin], or apoptosis [e.g., monoacylglycerophosphoserines, PS [17:1(9Z)/0:0]].

Serum Levels of Progesterone

In this study, the first ovulation was determined based on serum progesterone levels of 0.4 ng/mL or greater (Quirke et al., 1985; Wright et al., 2002). According to the pattern of serum progesterone, and considering the whole experimental period (from birth to 9.5 mo old), 4 ewe lambs of the ADLB group evidenced a first ovulation when they were 194 ± 36.1 d old versus only 1 animal (235 d old) from the RES group.

DISCUSSION

The present study was designed to quantify the effect of MR restriction (suckling phase) on animal perfor-

Table 5. List of identified metabolites (variable importance in projection, VIP, score >1.3) differentially accumulated in plasma samples from restricted replacement ewe lambs (RES) when compared with those fed ad libitum (ADLB) during the artificial rearing phase

Metabolite	VIP score	Log ₂ FC ¹	Regulation ²
Lipid metabolites ³			
PA [20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/21:0]	1.517	-5.646	Down
PA [18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/14:1(9Z)]	1.421	5.227	Up
PA [18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/18:3(6Z,9Z,12Z)]	1.387	3.344	Up
PA [18:3(9Z,12Z,15Z)/15:1(9Z)]	1.320	0.062	Up
PE (20:0/0:0)	1.692	-5.218	Down
PE [18:0/22:6(4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z)(14OH)]	1.501	0.221	Up
PG [16:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)]	1.885	0.241	Up
PG [18:3(9Z,12Z,15Z)/18:2(9Z,12Z)]	1.775	0.256	Up
PG [18:3(9Z,12Z,15Z)/15:1(9Z)]	1.609	0.088	Up
PG [21:0/20:3(8Z,11Z,14Z)]	1.371	3.172	Up
PG [22:2(13Z,16Z)/0:0]	1.313	0.014	Up
PI (15:0/14:0)	2.156	0.204	Up
PI [18:0/18:3(6Z,9Z,12Z)]	1.701	0.335	Up
PI [18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/18:0]	1.487	3.398	Up
PI (O-18:0/0:0)	1.402	1.663	Up
PPA [16:0/18:1(9Z)]	2.047	0.199	Up
PPA [18:1(9Z)/18:1(9Z)]	1.538	0.199	Up
PS [17:1(9Z)/0:0]	1.929	6.041	Up
PS [19:1(9Z)/12:0]	1.845	0.100	Up
MG [0:0/24:1(15Z)/0:0]	1.576	0.091	Up
Taurocholic acid	1.723	3.927	Up
Cimicifetiside A	1.787	0.171	Up
Minabeolide-8	1.643	6.579	Up
Triacetin	1.428	0.271	Up
3-Propylmalic acid	1.446	0.259	Up
10-Nitrooleate	1.380	0.025	Up
Vitamin D metabolism			
(5E)-(24R)-24,25-dihydroxy-(6,19,19-trideutrio) vitamin D ₃	1.497	3.019	Up
1 α ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24a-homo-22-thia-20-epivitamin D ₃	1.381	3.304	Up
11 α -(4-dimethylaminophenyl)-1 α ,25-dihydroxyvitamin D ₃	1.308	0.038	Up
AA metabolism			
Ne-Methyl-L-lysine	1.726	0.426	Up
2-Oxoarginine	1.618	3.565	Up
N-Arachidonoyl histidine	1.554	0.308	Up
Thr Phe Arg	1.713	-0.174	Down
Arg Gln Ile	1.448	0.183	Up
Phe Phe Leu	1.435	5.694	Up
His Glu	1.430	0.620	Up
Asn Arg Arg	1.340	0.046	Up
Tyr Lys Ile	1.322	-4.701	Down
Eicosanoid-like			
Prostaglandin E ₂ -biotin	1.926	0.096	Up
Phenolic compounds			
Trihydroxycoprostanic acid	1.715	0.291	Up
Vomicine	1.569	0.098	Up
Acacetin 7-(4"-acetylrutinoside)	1.368	0.382	Up
Thalicoside A	1.301	0.338	Up
Other metabolites			
Guanine	1.744	-2.194	Down
Glycosyl-4,4'-diaponeurosporenoate	1.985	10.192	Up
Avermectin A2a monosaccharide	1.345	4.556	Up
Avocado acetate	1.716	4.546	Up
UDP-D-apiose ⁴	1.377	-0.113	Down

¹FC = fold change.²Analysis were done considering RES versus ADLB; hence, "up" means the compound is overaccumulated in RES as compared with the ADLB group.³PA = diacylglycerophosphates; PE = monoacylglycerophosphoethanolamines; PG = diacylglycerophosphoglycerols; PI = diacylglycerophosphoinositols; PPA = diacylglyceropyrophosphates; PS = monoacylglycerophosphoserines; MG = monoacylglycerols.⁴UDP-D-apiose = uridine 5'-diphosphate-D-apiose.

mance and progesterone patterns during the replacement period of ewe lambs to elucidate the mechanisms responsible for the effects promoted by a metabolome approach. This is relevant because the intake of MR can be reduced on farm due to unhealthy status of the lambs, environmental conditions (e.g., hot weather during the summer; good/bad barn hosting the lambs), or inadequate management of the artificial MR, thus lowering profitability during postweaning phases.

Similar to other studies under feed restriction conditions (Drouillard et al., 1991; dos Santos et al., 2016), the RES preweaned lambs were slaughtered with a lower LBW, which explains the reduced weight of all the organs and carcass or noncarcass components registered at slaughter (data not shown). However, it must be stressed that the proportion of several parts of the gut (e.g., reticulorumen and abomasum) was increased when calculated as a percentage of the EDT, whereas the average villus height in the ileal epithelium was shorter in the RES preweaned lamb. This is in agreement with the results obtained by Greenwood et al. (2004), who observed at a similar LBW (20 kg) that slowly reared lambs (low nutrition) had a larger stomach complex than those reared *ad libitum*. Our previous experiments in fattening lambs (Santos et al., 2018b) have demonstrated that all these morphological changes can persist at a LBW of 27 kg, thus 3 mo later after having finished the period of feed restriction. However, the experimental period of the present study was extended much longer, which might have had consequences on the morphology of the gut, as will be explained below.

Moreover, as expected, the RES replacement ewe lambs grew up more slowly during the suckling period as a consequence of commercial MR restriction. Once weaned, a compensatory growth period was observed for the RES group (first postweaning period) while they were being fed the starter feed (more energetic) together with alfalfa hay and barley straw administered in separate feeders. During this phase, ADLB ewe lambs were supposed to be depositing fat, whereas the weight gain of RES ewe lambs was probably composed mainly by protein and muscle due to a temporary reduction of their adipose tissue during the feed restriction period (Berge, 1991; Hornick et al., 2000); this fact, together with the lower maintenance energy requirements during the compensatory growth period as a consequence of a lower LBW (Saubidet and Verde, 1976) would help to explain the higher ADG of RES ewe lambs during the first postweaning period. A second explanation for the compensatory growth might be related to an increased DMI of RES lambs during this phase. In any case, RES animals were older at the end of the first postweaning period (identical LBW for both groups) because LBW

differences did not disappear totally after compensatory growth (Hornick et al., 2000).

Thereafter, in accordance with other studies (Davies and Owen, 1967; Galvani et al., 2014), ADG of the RES group was decreased during the second postweaning period, when the replacement ewe lambs were being fed the TMR with no chance to select the ingredients in different feeders. At this point, the greater forestomachs (and probably slower rate of passage) or the different growth of the gut regions caused by early feed restriction might have reduced DMI in the RES ewe lambs (Berge, 1991; Greenwood and Cafe, 2007). This reduced ADG might have been enhanced in RES ewe lambs due to an increased fat deposition once the compensatory growth period was finished (Berge, 1991; Hornick et al., 2000).

However, the lack of effects on ADG, RFI, feed-to-gain ratio, or apparent digestibility parameters during the third postweaning period suggests that the plasticity of the gut might have corrected, at least partially, the morphological changes after several months of being fed a TMR rich in fiber (Chilliard et al., 1998). Moreover, Berge (1991) and Hennessy and Arthur (2004) described that FE is little affected in the long term by nutrition before weaning due to the progressive reduction of differences in the composition of body gain during the refeeding period. However, regardless of the lack of effects on FE during this last postweaning phase, the RES replacement ewe lambs showed reduced LBW at the end of the experimental period as a clear sequel of early feed restriction, which limited the capacity to exhibit compensatory growth and achieve equivalent weight for age in later life (Allden, 1979; Berge, 1991; Hornick et al., 2000; Greenwood and Cafe, 2007).

Furthermore, the metabolomic profile was performed to understand the mechanisms under the sequels of early feed restriction. Accordingly, this approach revealed that many metabolites related to lipid metabolism were over-accumulated in the RES ewe lambs. However, as previously stated, a higher fat accretion was not supposed to take place during the third postweaning period of RES ewe lambs, so these metabolites might be indicating other alterations different from fat accretion (Berge, 1991). In this sense, the over-accumulation in the RES group of phosphatidylserine compounds [e.g., PS (17:1(9Z)/0:0), PS (19:1(9Z)/12:0), which are involved in fundamental processes of apoptosis] and PGE₂-biotin (one of the most abundant metabolites of arachidonic acid) is remarkable. These metabolites are indicators of intracellular stress and inflammatory response of the RES replacement ewe lambs (Ricciotti and FitzGerald, 2011; Vance and Guergana, 2013), which might have been caused by the over-accumulation of several alkaloids (e.g., vomisine), flavonoids [e.g.,

acacetin 7-(4"-acetylrutinoside)], triterpenes (e.g., trihydroxycoprostanic acid), and bile acid metabolites (e.g., taurocholic acid) with cytotoxic effects (Trevisi et al., 2012).

Moreover, the increased accumulation of PGE₂-biotin in RES animals (a structural analog of PGE₂) detected by the metabolome profile could also have implications on reproductive function because an apparent prerequisite for ovulation in sheep is a major accumulation of PGF_{2α} with respect to PGE₂ during the later phase of the preovulatory period (Murdoch and Farris, 1988). Therefore, the higher levels of PGE₂ might have delayed the first ovulation in the RES replacement ewes lambs. With this regard, the establishment of the age of puberty was not one of the aims of the present study because these animals born at the end of August were expected to remain prepubertal until the short days in the following autumn (Corner-Thomas et al., 2015), much later after the end of the experimental phase (9.5 mo old, at the beginning of June). However, the progesterone levels measured along the whole experiment revealed that 5 replacement ewes had ovulated for the first time (4 ADLB vs. 1 RES), even though they failed to initiate regular cyclicity (regular progesterone levels greater than 0.4 ng/mL) and estrus exhibition. Moreover, the RES replacement ewe lamb reaching the first ovulation was older (235 d) than the 4 ADLB ewes (194 ± 36.1 d), which suggests a delay in the first ovulation (Robinson et al., 2002, 2005).

CONCLUSIONS

Under these experimental conditions, FE of replacement ewe lambs was not impaired by moderated MR restriction during early life. However, the lower LBW and the different progesterone levels at the end of the experimental period suggest the existence of long-term effects caused by early feed restriction. Therefore, future experiments should clarify the effects of early feed restriction on the reproductive traits (e.g., puberty, conception, fertility, and prolificity rates), subsequent lactations, or FE of the progeny of these Assaf replacement ewe lambs, and also the mechanisms underlying any detrimental consequence found to design strategies to correct it.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO, AGL2014-54124R). Alba Santos gratefully acknowledges receipt of a predoctoral grant from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (MECD,

FPU15/01630). We also thank Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC; Proyecto Intramural Especial; Project 201540E084) and University of León (Ayudas Puente Formativas) for supporting J. Frutos. The authors gratefully thank Julio Benavides (Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-Universidad de León) for providing histological sections of intestinal samples. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Allden, W. G. 1979. Undernutrition of the Merino sheep and its sequelae. V.* The influence of severe growth restriction during early post-natal life on reproduction and growth in later life. *Aust. J. Agric. Res.* 30:939–948. <https://doi.org/10.1071/AR9790939>.
- AOAC International. 2003. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Bell, A., and P. Greenwood. 2016. Nutrition during gestation influences postnatal productivity of ruminant livestock. *Feedipedia, Broadening Horizons*. No. 30.
- Berge, P. 1991. Long-term effects of feeding during calfhood on subsequent performance of beef cattle (a review). *Livest. Prod. Sci.* 28:179–201. [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(91\)90142-D](https://doi.org/10.1016/0301-6226(91)90142-D).
- Bodas, R., N. Prieto, M. J. Jordán, O. López-Campos, F. J. Giráldez, L. Morán, and S. Andrés. 2012. The liver antioxidant status of fattening lambs is improved by naringin dietary supplementation at 0.15% rates but not meat quality. *Animal* 6:863–870. <https://doi.org/10.1017/S175173111100214X>.
- Cardarelli, M., Y. Roupheal, E. Rea, L. Lucini, M. Pellizzoni, and G. Colla. 2013. Effects of fertilization, arbuscular mycorrhiza, and salinity on growth, yield, and bioactive compounds of two *Aloe* species. *HortScience* 48:568–575.
- Carrillo, J. A., Y. He, Y. Li, J. Liu, R. A. Erdman, T. S. Sonstegard, and J. Song. 2016. Integrated metabolomic and transcriptome analyses reveal finishing forage affects metabolic pathways related to beef quality and animal welfare. *Sci. Rep.* 6:25948. <https://doi.org/10.1038/srep25948>.
- Chilliard, Y., F. Bocquier, and M. Doreau. 1998. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod. Nutr. Dev.* 38:131–152. <https://doi.org/10.1051/rnd:19980201>.
- Corner-Thomas, R. A., A. L. Ridler, S. T. Morris, and P. R. Kenyon. 2015. Ewe lamb live weight and body condition scores affect reproductive rates in commercial flocks. *N. Z. J. Agric. Res.* 58:26–34. <https://doi.org/10.1080/00288233.2014.974766>.
- Davies, D. A. R., and J. B. Owen. 1967. The intensive rearing of lambs 1. Some factors affecting performance in the liquid feeding period. *Anim. Sci.* 9:501–508. <https://doi.org/10.1017/S0003356100042070>.
- dos Santos, A. A., P. G. Pimentel, E. S. Pereira, G. R. Moreira, J. A. D. Barbosa Filho, I. Y. Izubuti, E. L. A. Ribeiro, and D. L. Sousa. 2016. Carcass and non-carcass components of Santa Ines lambs subjected to food restriction. *Semin. Cienc. Agrar.* 37:947–958. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n2p947>.
- Drackley, J. K., B. C. Pollard, H. M. Dann, and J. A. Stamey. 2007. First-lactation milk production for cows fed control or intensified milk replacer programs as calves. *J. Dairy Sci.* 90(Suppl. 1):614. (Abstr.)
- Drouillard, J. S., T. J. Klopfenstein, R. A. Britton, M. L. Bauer, S. M. Gramlich, T. J. Wester, and C. L. Ferrell. 1991. Growth, body composition, and visceral organ mass and metabolism in lambs during and after metabolizable protein or net energy restrictions. *J. Anim. Sci.* 69:3357–3375. <https://doi.org/10.2527/1991.6983357x>.
- Galvani, D. B., C. C. Pires, C. H. Hübner, S. Carvalho, and T. P. Wommerd. 2014. Growth performance and carcass traits of early-

- weaned lambs as affected by the nutritional regimen of lactating ewes. *Small Rumin. Res.* 120:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.03.008>.
- Giráldez, F. J., P. Frutos, P. Lavín, and A. R. Mantecón. 1999. Body composition changes and energy retention in milk-fed lambs undergoing energy restriction. *Small Rumin. Res.* 31:127–133. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(98\)00129-1](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(98)00129-1).
- Gotoh, T. 2015. Potential of the application of epigenetics in animal production. *Anim. Prod. Sci.* 55:145–158. <https://doi.org/10.1071/AN14467>.
- Greenwood, P. L., and L. M. Cafe. 2007. Prenatal and pre-weaning growth and nutrition of cattle: long-term consequences for beef production. *Animal* 1:1283–1296. <https://doi.org/10.1017/S175173110700050X>.
- Greenwood, P. L., A. S. Hunt, and W. Bell. 2004. Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: IV. Organ growth. *J. Anim. Sci.* 82:422–428. <https://doi.org/10.2527/2004.822422x>.
- Hennessy, D. W., and P. F. Arthur. 2004. The effect of preweaning growth restriction on the feed intake and efficiency of cattle on a grain-based diet before slaughter. *Aust. J. Exp. Agric.* 44:483–488. <https://doi.org/10.1071/EA02110>.
- Hornick, J. L., C. Van Eenae, O. Gérard, I. Dufrasne, and L. Istasse. 2000. Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domest. Anim. Endocrinol.* 19:121–132. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(00\)00072-2](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(00)00072-2).
- ISO. 1999. Animal feeding stuffs—Determination of moisture and other volatile matter content. ISO 6496:1999. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO. 2002. Animal feeding stuffs—Determination of crude ash. ISO 5984:2002. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO. 2005. Animal feeding stuffs—Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content, Kjeldahl method. ISO 5983:2005. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Kaske, M., S. Wiedemann, and H.-J. Kunz. 2010. Metabolic programming. Background and potential impact for dairy cattle. *Vlaams Diergen. Tijds.* 79:445–451.
- Koch, R. M., L. A. Swiger, D. Chambers, and K. E. Gregory. 1963. Efficiency of feed use in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 22:486–494.
- Makovicky, P., E. Tumova, Z. Volek, P. Makovicky, and P. Vodicka. 2014. Histological aspects of the small intestine under variable feed restriction: The effects of short and intense restriction on a growing rabbit model. *Exp. Ther. Med.* 8:1623–1627. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1924>.
- Murdoch, W. J., and M. L. Farris. 1988. Prostaglandin E₂-9-ketoreductase activity of preovulatory ovine follicles. *J. Anim. Sci.* 66:2924–2929. <https://doi.org/10.2527/jas1988.66112924x>.
- Neto, S. G., L. R. Bezerra, A. N. Medeiros, M. A. Ferreira, E. C. Pimenta Filho, E. P. Cândido, and R. L. Oliveira. 2011. Feed restriction and compensatory growth in Guzerá females. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 24:791–799. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10417>.
- NRC. 1985. Nutrient Requirements of Sheep. 6th ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Quirke, J. F., G. H. Stabenfeldt, and G. E. Bradford. 1985. Onset of puberty and duration of the breeding season in Suffolk, Rambouillet, Finnish Landrace, Dorset and Finn-Dorset ewe lambs. *J. Anim. Sci.* 60:1463–1471. <https://doi.org/10.2527/jas1985.6061463x>.
- Ricciotti, E., and G. A. FitzGerald. 2011. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31:986–1000. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>.
- Robinson, J. J. 1996. Nutrition and reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 42:25–34. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01526-6](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01526-6).
- Robinson, J. J., C. J. Ashworth, J. A. Rooke, L. M. Mitchell, and T. G. McEvoy. 2005. Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126:259–276. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.006>.
- Robinson, J. J., J. A. Rooke, and T. G. McEvoy. 2002. Nutrition for conception and pregnancy. Pages 189–211 in *Sheep Nutrition*. M. Freer and H. Dove, ed. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Rombouts, C., L. Y. Hemeryck, T. Van Hecke, S. De Smet, W. H. De Vos, and L. Vanhaecke. 2017. Untargeted metabolomics of colonic digests reveals kynurenine pathway metabolites, dihydroxy and 3-dehydroxycarnitine as red versus white meat discriminating metabolites. *Sci. Rep.* 7:42514. <https://doi.org/10.1038/srep42514>.
- Rouphael, Y., J. Bernardi, M. Cardarelli, L. Bernardo, D. Kane, G. Colla, and L. Lucini. 2016. Phenolic compounds and sesquiterpene lactones profile in leaves of nineteen artichoke cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 64:8540–8548. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03856>.
- Santos, A., F. J. Giráldez, J. Mateo, J. Frutos, and S. Andrés. 2018a. Programming Merino lambs by early feed restriction reduces growth rates and increases fat accretion during the fattening period with no effect on meat quality traits. *Meat Sci.* 135:20–26. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.08.007>.
- Santos, A., F. J. Giráldez, E. Trevisi, L. Lucini, J. Frutos, and S. Andrés. 2018c. Liver transcriptomic and plasma metabolic profiles of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period. *J. Anim. Sci.* 96:1495–1507. <https://doi.org/10.1093/jas/sky029>.
- Santos, A., C. Valdés, F. J. Giráldez, S. López, J. France, J. Frutos, M. Fernández, and S. Andrés. 2018b. Feed efficiency and the liver proteome of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period. *Animal* 1–9. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000046>.
- Saubidet, C. L., and L. S. Verde. 1976. Relationship between live weight, age and dry-matter intake for beef cattle after different levels of food restriction. *Anim. Prod.* 22:61–69. <https://doi.org/10.1017/S000335610003542X>.
- Trevisi, E., M. Amadori, S. Cogrossi, E. Razzuoli, and G. Bertoni. 2012. Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 93:695–704. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.11.008>.
- Van Keulen, J., and B. A. Young. 1977. Evaluation of acid-insoluble ash as natural marker in ruminant digestibility. *J. Anim. Sci.* 44:282–287. <https://doi.org/10.2527/jas1977.442282x>.
- Vance, J. E., and T. Guergana. 2013. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1831:543–554. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2012.08.016>.
- Wright, C., A. C. Evans, N. P. Evans, P. Duffy, J. Fox, M. P. Boland, J. F. Roche, and T. Sweeney. 2002. Effect of maternal exposure to the environmental estrogen, octylphenol, during fetal and/or postnatal life on onset of puberty, endocrine status, and ovarian follicular dynamics in ewe lambs. *Biol. Reprod.* 67:1734–1740. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.101.002006>.

DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo, se estudió el efecto de la restricción de alimento en la fase de lactancia de corderos lechales sobre la eficiencia alimentaria durante los periodos de cebo y recría, así como los mecanismos moleculares subyacentes que intervienen en el proceso y las implicaciones productivas.

Todos los resultados obtenidos han sido previamente discutidos en los artículos correspondientes. Por ello, teniendo en cuenta el enfoque holístico e interdisciplinar del presente trabajo de investigación, en esta sección se tratará de presentar una discusión general de todos los resultados obtenidos, agrupados en cuatro apartados:

- Eficiencia alimentaria y rendimiento productivo.
- Restricción alimentaria y mecanismos moleculares.
- Calidad de la canal y de la carne.
- Establecimiento de la pubertad.

Eficiencia alimentaria y rendimiento productivo

Como ya se ha comentado anteriormente, existen muchos factores que pueden afectar la eficiencia alimentaria en el ganado, siendo la nutrición durante la gestación y en las primeras etapas de vida uno de los más importantes (Tudor y O'Rourke, 1980; Greenwood y Cafe, 2007). Así, la calidad y disponibilidad de alimento durante la lactancia serán determinantes en el crecimiento posterior de los animales, ya que pueden dar lugar a fenómenos de programación metabólica que afecten a toda la vida del animal, incluso cuando el efecto que los ha provocado (p. ej., restricción alimentaria) ha desaparecido (Lucas, 1998; Barker, 2007; Meyer *et al.*, 2012; Bach, 2012; Gotoh, 2015).

En este contexto, las posibles estrategias para reducir los costes de producción del ganado podrían incluir la imposición de restricciones alimentarias seguidas de un periodo de realimentación. Numerosos trabajos han estudiado la restricción de alimento pre- y posnatal como estrategia para aumentar la eficiencia alimentaria de los animales de abasto. De esta forma, una vez se reestablece el nivel de alimentación adecuado, los animales responden incrementando su tasa de crecimiento, en muchas ocasiones como consecuencia del crecimiento compensatorio y la reducción de las necesidades de mantenimiento observada en estos animales al final del periodo de restricción (Murphy y Loerch, 1994; Abouheif *et al.*, 2013). Por tanto, la restricción alimentaria temprana podría ser una táctica económicamente viable para la explotación. Sin embargo, otros autores

han descrito, en el ganado vacuno, una disminución del rendimiento productivo y la eficiencia alimentaria en el periodo posdestete como consecuencia de la restricción de alimento en etapas tempranas de la vida (como la lactancia) (Greenwood y Café, 2007, Soberon *et al.*, 2012), aunque existen pocos datos referentes a lo que sucede en el ganado ovino (Galvani *et al.*, 2014). En este sentido, es importante mencionar que la disparidad entre los diferentes estudios puede ser explicada por las diversas condiciones experimentales empleadas en cada uno de ellos: intensidad, duración y momento de la restricción alimentaria, así como la especie, raza, sexo y el periodo en el que se evalúa el efecto tras la restricción.

En el presente trabajo, como cabría esperar dado el diseño experimental, en ambas pruebas los animales del grupo restringido (RES) presentaron menores GDP durante la lactancia. En el primer experimento (Exp. I), además, se observó una menor GDP y un mayor IC en estos animales durante el periodo de cebo, cuando todos los corderos se alimentaron con la misma ración administrada al mismo nivel de ingestión. Esta circunstancia evitaría diferencias en la ingestión, uno de los factores que se ha asociado con el crecimiento compensatorio (Thomson *et al.*, 1982; Randall *et al.*, 1998) y que, además, puede determinar diferencias en el índice de conversión consecuencia de una modificación en la proporción de la energía ingerida que se destina a mantenimiento, sin cambios en la eficiencia.

Sin embargo, en el segundo experimento (Exp. II) sí se observó un crecimiento compensatorio en el grupo RES una vez que los animales fueron destetados y alimentados con pienso de arranque (primer periodo posdestete). Durante el 2º periodo posdestete, en cambio, se encontró una mayor GDP en el grupo *ad libitum* (ADL). No obstante, al contrario que en el Exp. I, no se observaron diferencias significativas en la GDP, el IC y el RFI durante la última fase posdestete (recría) entre los dos grupos, a pesar de que el peso vivo al final del experimento fue numéricamente menor en los animales restringidos. Asimismo, tampoco se encontraron diferencias en la ingestión de materia seca (IMS) durante este periodo entre los dos grupos. Es oportuno destacar que en esta última fase los animales recibieron una ración con un elevado porcentaje de forraje, mucho mayor que en la ración utilizada en el experimento de cebo intensivo, y ello podría condicionar la respuesta.

En cualquier caso, la restricción de alimento en la fase de lactancia produjo un retraso en el ritmo de crecimiento en etapas posteriores en ambos experimentos. En este

sentido, Greenwood y Cafe (2007) demostraron que una restricción del crecimiento en etapas tempranas de la vida reduce el potencial de producción, dando como resultado animales más pequeños a cualquier edad. Estos autores, sin embargo, también observaron que la restricción de alimento durante la lactancia no afecta a la eficiencia de utilización de los nutrientes en etapas posteriores de la vida (IC y RFI).

Como se señaló anteriormente, en el Exp. I. los animales se alimentaron al mismo nivel de ingestión durante el periodo de cebo y comenzaron la fase de cebo con similar peso vivo. Por ello, las diferencias encontradas en la eficiencia alimentaria (IC), peso vivo, etc. se deben a factores no asociados con el nivel de ingestión (p. ej., composición corporal, tamaño de los órganos, características morfológicas del intestino, cambios a nivel metabólico), como comentaremos más adelante.

Así, por ejemplo, un peso reducido de las vísceras implicaría una tasa metabólica más baja, por lo que una proporción relativamente mayor de energía y proteína se puede utilizar para cubrir las necesidades de crecimiento (Hornick *et al.*, 2000). En el Exp. I no se observaron diferencias en el peso del tracto gastrointestinal, pero el intestino delgado representó una menor proporción respecto al peso total del intestino en el grupo RES. Estas modificaciones no se tradujeron en diferencias en la digestibilidad total, pero sí podrían haber influido en la proporción digerida en los diferentes tramos del tracto gastrointestinal, lo que sí podría afectar a la eficiencia.

En las corderas del Exp. II no se observaron diferencias en el RFI, pero sí en la proporción del retículo-rumen con respecto al tracto digestivo, que fue más alta en las corderas lactantes del grupo RES. Es importante señalar, como ya se mencionó anteriormente, que en el Exp. II se empleó una dieta con un mayor porcentaje de forraje, por lo que la digestión en el rumen adquiere mayor relevancia que en el experimento de cebo intensivo.

Las diferencias entre ambos experimentos también se constataron en los depósitos adiposos. Así, en el Exp. I se observó un aumento de la mayoría de los depósitos grasos en el grupo RES, excepto en la grasa mesentérica, que podría ser debida a las diferencias encontradas en la proporción del intestino delgado respecto al total. Estos resultados indican que la restricción de alimento durante la fase de lactancia de corderos provoca diferencias en el patrón de deposición de la grasa. En las corderas del Exp. II, por el contrario, se observó una menor proporción de grasa omental y una mayor proporción de

grasa mesentérica en los animales restringidos, que no concuerdan con las diferencias observadas en las proporciones de los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal. Las diferencias observadas entre experimentos pueden deberse al diferente momento de sacrificio de los corderos, pero también a las diferencias en la dieta posdestete administrada. En este sentido, se ha demostrado que si se proporciona una dieta altamente energética (concentrado) tras un periodo de restricción de alimento durante la lactancia, los animales con un crecimiento restringido podrían tener más cantidad de grasa, medida al mismo peso tras el destete (Greenwood y Cafe, 2007), lo que ocurre en los corderos del grupo RES durante la fase de cebo (Exp. I).

La mayor deposición de grasa intramuscular observada en los animales del grupo RES (Exp. I) podría haber afectado negativamente a la eficiencia con que los animales ganan peso, aumentando los índices de conversión y, por tanto, afectando negativamente a los parámetros de eficiencia alimentaria. Sin embargo, en términos de utilización de la energía, podrían haber sido más eficientes los corderos del grupo RES, en comparación al grupo ADL, debido a la mayor eficiencia de utilización de la energía para el depósito de grasa que de proteína (Owens *et al.*, 1995; Caton *et al.*, 2000; Herd y Arthur, 2009).

Como ya se mencionó, en ambos experimentos, la restricción temprana de alimento no afectó a la digestibilidad, ni tampoco a los parámetros de fermentación o la microbiota del contenido ruminal e intestinal. Sin embargo, la longitud media de las vellosidades fue menor en el epitelio del íleon del grupo RES, tanto en las corderas durante la fase de lactancia (Exp. II), como en los corderos al final de la fase de cebo (Exp. I), sugiriendo que el efecto observado durante la lactancia podría mantenerse durante etapas posteriores de la vida. Otros autores también encontraron una relación estadísticamente significativa entre la morfología del intestino y la eficiencia alimentaria. Así, Meyer *et al.* (2014) encontraron una correlación negativa entre la densidad de la mucosa yeyunal y el RFI en el ganado. Por su parte, Montanholi *et al.* (2013) observaron un mayor número de células en el epitelio duodenal e ileal de novillos con bajo RFI, en contraposición a los animales con alto RFI. Por tanto, las diferencias observadas en la morfología intestinal podrían ser una de las causas del menor crecimiento posdestete (Exp. I y II) y de la menor eficiencia alimentaria (Exp. I) observados en el grupo RES, debido a la peor absorción intestinal de nutrientes (Fitzsimons *et al.*, 2017). A pesar de ello, como ya se ha comentado, la ausencia de diferencias en la digestibilidad total no implica que puedan producirse diferencias en la digestibilidad en los diferentes segmentos

del tracto digestivo, que podrían influir o no en la eficiencia alimentaria dependiendo del tipo de dieta y del nivel de ingestión.

Restricción alimentaria y mecanismos moleculares

Tomando en conjunto los resultados del perfil proteómico y transcriptómico del hígado, así como del perfil metabolómico del plasma, en ambos experimentos se encontraron diferencias principalmente en el metabolismo de los lípidos, las proteínas y los carbohidratos, así como en las rutas de detoxificación de xenobióticos entre los dos grupos de animales. Estas diferencias pueden ser clave para comprender los efectos de la restricción alimentaria durante la lactancia sobre la eficiencia y el rendimiento productivo en las fases posdestete (cebo y recría).

En el primer experimento (Exp. I), los animales del grupo RES presentaron una menor expresión de los genes implicados en la ruta de la β -oxidación de ácidos grasos; esta podría ser una de las razones para el mayor contenido de grasa intramuscular y los mayores depósitos grasos de la no canal (hígado, grasa omental y grasa perirrenal) observados en el grupo RES, como también observaron otros autores (Kuhla *et al.*, 2009). Por el contrario, en las corderas lactantes del Exp. II se observó un aumento de la expresión génica de la β -oxidación en los animales restringidos, lo que concuerda con la menor cantidad de depósitos grasos (grasa omental, mesentérica y perirrenal) observada en este grupo con respecto al grupo ADL. Esta discordancia entre ambos experimentos puede ser debida al diferente momento de sacrificio de los animales. Las corderas del Exp. II se sacrificaron en la fase de restricción alimentaria (al final del periodo de lactancia), por lo cual en estos animales la β -oxidación de ácidos grasos estaría aumentada con el fin de cubrir las necesidades energéticas durante esta etapa. Por el contrario, los corderos del Exp. I se sacrificaron tras un periodo de realimentación (al final del periodo de cebo), por lo que las diferencias encontradas en esta fase indican los efectos de la restricción de alimento temprana a largo plazo (programación metabólica). Además, es importante señalar que en el Exp. II los animales sufrían largos periodos de ayuno intradía y no solo la cantidad de alimento sino también el intervalo entre comidas podría determinar diferencias en el metabolismo lipídico (Klein *et al.*, 1993; Soeters *et al.*, 2012).

Por otra parte, hay que tener en cuenta que la transición del estado de pre-rumiante a rumiante implica uno de los cambios más complejos en el metabolismo de la glucosa de los mamíferos (Donkin y Hammon, 2005). Mientras que para los animales pre-

rumiantes la glucosa constituye la principal fuente de energía, para los rumiantes adultos son los AGV (Booth, 2003). Asimismo, los corderos pasan por una transición en las primeras semanas de vida de una dieta líquida (leche) a una dieta sólida (pienso o forraje). Todo ello se asocia con la maduración de los sistemas digestivo, metabólico y endocrino (Donkin y Hammon, 2005; Greenwood *et al.*, 2005). De hecho, diversos estudios realizados en ovino sugieren que los recién nacidos con un retraso grave en el crecimiento son inmaduros con respecto al metabolismo energético y tienen un metabolismo más parecido al fetal que los animales bien desarrollados (Rhoads *et al.*, 2000a,b; Greenwood *et al.*, 2002).

Además, se ha demostrado que los carbohidratos de la dieta cubren más de la mitad de las necesidades energéticas para el mantenimiento, el crecimiento y la producción. Entre ellos, la glucosa representa una fuente de energía primaria para ciertos tejidos y órganos animales (cerebro, médula, eritrocitos, y riñones; Mayes, 1996) y es precursor para la síntesis de lactosa en la glándula mamaria (Nafikov y Beitz, 2007). Por ello, la gluconeogénesis es extremadamente importante para los rumiantes neonatos y adultos porque proporciona el 75% (Donkin y Hammon, 2005) y el 90% (Young, 1977) de las necesidades totales de glucosa, respectivamente.

De esta forma, en el Exp. II, el perfil transcriptómico y proteómico del hígado indican una disminución de la síntesis de glicerolípidos y ácidos grasos de cadena larga, así como un aumento de los procesos de lipólisis y β -oxidación de ácidos grasos en el grupo RES, con el fin de proporcionar sustratos esenciales (glicerol) y cofactores (NADPH y acetyl-CoA) para la gluconeogénesis. De hecho, en rumiantes en condiciones de restricción alimentaria, el glicerol se convierte en el principal sustrato gluconeogénico, en lugar del propionato (Donkin y Hammon, 2005; McDonald *et al.*, 2013).

Asimismo, las modificaciones en el catabolismo de las proteínas (Exp. II), con una mayor expresión de genes que participan en la degradación de diversos aminoácidos en el grupo RES, también implican un aumento de los sustratos gluconeogénicos. Esta mayor gluconeogénesis observada en el grupo RES concuerda, por tanto, con la etapa de restricción en la que se encontraban los animales. Además, el perfil proteómico indica una mayor acumulación en las corderas RES de enzimas implicadas en la degradación de aminoácidos y el catabolismo de proteínas. Por tanto, la restricción de lactorreemplazante en el grupo RES podría haber modificado los mecanismos gluconeogénicos como respuesta adaptativa frente al menor aporte de glucosa.

Por último, el perfil metabolómico de las corderas no sacrificadas en el periodo posdestete confirma estos resultados y sugiere que los cambios metabólicos producidos en el momento de la lactancia perduran en el animal a largo plazo, lo que puede explicar las diferencias encontradas en la GDP durante el periodo posdestete y en el peso vivo al final del experimento (Exp. II).

Además, en los corderos del Exp. I también se observó, al final de la fase de cebo, un mayor catabolismo y una menor síntesis de proteínas en el grupo RES (perfil transcriptómico y proteómico), lo que confirma que estos cambios permanecen en las fases posdestete. Así pues, parece ser que los animales restringidos durante la lactancia habrían aumentado el catabolismo proteico para satisfacer las necesidades de energía. Esto sería una de las causas que podrían explicar la mayor deposición de grasa y las diferencias encontradas en la eficiencia alimentaria entre ambos grupos (Exp. I). En este sentido, Cruzen *et al.* (2013) observaron una menor degradación de la proteína muscular en cerdos seleccionados para un menor RFI (más eficientes), lo que podría resultar en una mayor deposición de proteína en estos animales y, por tanto, explicaría la mayor eficiencia alimentaria.

En función de estos resultados, cabría esperar una mayor actividad de las enzimas involucradas en el ciclo de la urea. De hecho, las adaptaciones a largo plazo en la actividad del ciclo de la urea tienen lugar en respuesta a la restricción calórica en la dieta, la ingestión de proteína o el catabolismo de la proteína endógena (Morris, 1992; Tillman *et al.*, 1996; Velez y Donkin, 2005). Sin embargo, en las corderas restringidas (Exp. II) se observó, al final del periodo de lactancia, una menor expresión de genes relacionados con este proceso. De hecho, al finalizar el periodo de lactancia, los niveles plasmáticos de urea fueron menores en el grupo RES (7,29 vs. 4,63 mmol/L para las corderas ADL y RES del Exp. II, respectivamente; $P < 0,01$). Esto podría ser consecuencia de una menor formación de amoníaco en estos animales al haber menos sustrato disponible, o bien de un aumento en la proporción del amoníaco que es eliminado directamente, que reduciría el coste energético asociado con la síntesis de urea (Rodríguez *et al.*, 2007; Cruzen *et al.*, 2013). No obstante, estas diferencias en los niveles plasmáticos de urea no se mantuvieron a los 5 y a los 7,5 meses de edad (durante el 2º periodo posdestete) (Frutos *et al.*, 2018a), lo que sugiere que estos cambios adaptativos desaparecen a largo plazo, una vez que la alimentación se ha reestablecido con normalidad.

Por otra parte, en la especie bovina, diversos autores han observado mayores niveles de estrés oxidativo y mayor expresión de enzimas antioxidantes en el hígado de los animales menos eficientes (Chen *et al.*, 2011; Al-Husseini *et al.*, 2014; Paradis *et al.*, 2015; Tizioto *et al.*, 2015). En este sentido, Cantalapiedra-Hijar *et al.* (2018), mediante redes de interacción génica, identificaron el estrés oxidativo como uno de los principales mecanismos biológicos involucrados en la variación en la eficiencia alimentaria del ganado vacuno entre los animales, a partir de un análisis detallado de estudios recientes y representativos en cada nivel funcional (genes, ARN, proteínas y metabolitos asociados con el RFI). Así, en las corderas lactantes del Exp. II se observó un aumento del estrés oxidativo y la inflamación en el grupo RES (perfil transcriptómico y proteómico), lo cual podría ser una de las causas de las diferencias observadas en la GDP y en el peso vivo final entre ambos grupos experimentales en el periodo posdestete de recría, a pesar de la ausencia de diferencias en la eficiencia alimentaria (RFI). Estos cambios parecen haberse mantenido al final del experimento, cuando el perfil metabolómico del plasma indicó una mayor acumulación de metabolitos relacionados con la inflamación y la apoptosis en el grupo RES (p. ej., prostaglandina E₂-biotina, fosfatidilserina). Dicho estrés oxidativo podría ser consecuencia, a su vez, de la mayor expresión de genes implicados en la β -oxidación de ácidos grasos observada en las corderas lactantes del grupo RES (Madan *et al.*, 2006).

Sin embargo, en el Exp. I, el perfil transcriptómico del hígado realizado tras finalizar el periodo de cebo puso de manifiesto una menor expresión de genes implicados en el estrés oxidativo en el grupo RES. Esto concuerda con los menores valores de TBARS hallados durante la fase de cebo en el hígado de los corderos del grupo RES (5,17 vs. 3,22 μg de MDA/g de muestra para los corderos ADL y RES del Exp. I, respectivamente; $P=0,005$; Frutos *et al.*, 2018b), lo que sugiere que la peroxidación lipídica se encuentra disminuida como consecuencia del menor catabolismo de grasas observado en estos animales. A pesar de ello, los caracteres productivos indicaron una menor eficiencia alimentaria (IC) en este grupo durante la fase de cebo. No obstante, en los animales del grupo RES se observó también una menor expresión de genes que participan en la fosforilación oxidativa y en la cadena de transporte de electrones (p. ej., *ND3*), lo que podría indicar una actividad reducida de la función mitocondrial, que podría haber contribuido a la menor eficiencia alimentaria observada en estos animales. De hecho, se ha demostrado que un incremento de la función mitocondrial podría contribuir

a la mejora de la eficiencia alimentaria (Connor *et al.*, 2010; Cantalapiedra *et al.*, 2018). Así, diversos autores observaron en vacuno (Kolath *et al.*, 2006; Lancaster *et al.*, 2014), ovino (Sharifabadi *et al.*, 2012) y broilers (Bottje *et al.*, 2002) un mejor acoplamiento de la cadena de transporte de electrones en los animales más eficientes, así como una mayor actividad de los complejos de proteínas de dicha cadena (I, II, III y IV), lo que se asocia con una menor fuga de electrones y una menor producción de ROS. Todo ello indica que estos animales son más eficientes en la producción de ATP y, por tanto, en la generación de energía.

Por otro lado, la menor actividad mitocondrial observada en el grupo RES podría ser la causa de la menor β -oxidación de ácidos grasos observada en estos animales (perfil transcriptómico y proteómico) (Wajner y Amaral, 2016). Hay que tener en cuenta que los ácidos grasos y los lípidos asociados juegan un papel importante en la estructura y función de los cardiomiocitos. Existen claras evidencias de que, en el corazón de los mamíferos en la etapa postnatal y adulta, la oxidación de los ácidos grasos es la principal vía para la obtención de la energía que se requiere para un bombeo cardíaco eficiente. De esta manera, un defecto en el metabolismo mitocondrial de los ácidos grasos podría provocar un déficit en la producción de energía y, por tanto, un fallo cardíaco (estado fisiopatológico donde el corazón no puede cumplir con los requisitos metabólicos del cuerpo) (Marín-García y Goldenthal, 2002). Esto podría explicar el mayor peso del corazón encontrado en los corderos restringidos al final de la fase de cebo (Exp. I), el cual habría aumentado su tamaño para compensar el déficit energético del organismo. Estas modificaciones podrían ser indicativas, por tanto, de la existencia de una miocardiopatía hipertrófica en estos animales (Marín-García y Goldenthal, 2002; Harvey y Leinwand, 2011; Meyers *et al.*, 2013; Fillmore *et al.*, 2014). Como consecuencia, el aumento de tamaño de dicho órgano podría haber aumentado las necesidades energéticas de mantenimiento de los animales RES, disminuyendo, por tanto, la eficiencia con la que utilizan el alimento (Ferrell y Koong, 1987; Fitzsimons *et al.*, 2014; Kenny *et al.*, 2018).

Finalmente, se observó que la restricción de alimento durante la lactancia daba lugar a diferencias en el metabolismo de xenobióticos, tanto en la fase de lactancia de las corderas (Exp. II), como en las fases posdestete de cebo y de recría (Exp. I y II). Es bien sabido que la nutrición desempeña un papel importante en el correcto funcionamiento de los mecanismos de detoxificación (Netter, 2002). En este sentido, diversos estudios realizados en ratas han puesto de manifiesto el efecto de la restricción alimentaria sobre

la actividad de las principales enzimas encargadas de metabolizar los xenobióticos (p. ej., CYP450, glutatión-S-transferasa) (Sohn y Fiala, 1995; Stott *et al.*, 2004). Esta podría ser una ruta clave que afectase a los caracteres de eficiencia alimentaria. De hecho, otros estudios también han demostrado que la detoxificación de xenobióticos es una vía importante en la expresión diferencial de genes entre los animales seleccionados divergentemente para el RFI, destacando la importante relación entre este proceso metabólico y la variación en el RFI (Chen *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Alexandre *et al.*, 2015; Tizioto *et al.*, 2015; Tizioto *et al.*, 2016). En este sentido, Tizioto *et al.* (2016) sugieren que un mal funcionamiento de los mecanismos de detoxificación puede dar lugar a un exceso de producción de ROS o una disminución de la capacidad de reducción de ROS, lo que a su vez puede causar un aumento del estrés oxidativo, afectando así a la eficiencia alimentaria.

Por todo ello, tanto los genes diferencialmente expresados, como las proteínas y metabolitos acumulados diferencialmente entre grupos en el presente trabajo, podrían ser marcadores candidatos para la variación en el RFI (y, por tanto, en la eficiencia alimentaria) en ovejas, proporcionando más información sobre los mecanismos moleculares que subyacen en los caracteres relacionados con la eficiencia alimentaria.

Calidad de la canal y de la carne

Como ya se analizó en el apartado de revisión bibliográfica, la restricción de alimento durante la lactancia y la selección de animales eficientes puede influir en las características de la canal y de la carne. Los efectos de la nutrición son marcados en el crecimiento del animal y en las futuras características de su canal y carne (*post mortem*). Así, la nutrición recibida por el animal afecta directamente a la cantidad de grasa depositada y al color de la misma, así como al pH, color, terneza, jugosidad y flavor de la carne (Beriain *et al.*, 2000; Sami *et al.*, 2004).

Sin embargo, en muchas ocasiones, es complicado discriminar el efecto de los diferentes factores que pueden afectar a la calidad de la canal y de la carne, como la edad o peso al sacrificio, la nutrición recibida, manejo, etc. (Beriain *et al.*, 2000; Sami *et al.*, 2004). En el Exp. I, los animales se sacrificaron al mismo peso y, si bien se observaron diferencias en la edad de sacrificio (los corderos del grupo restringido tardaron más en alcanzar el peso de sacrificio), las diferencias encontradas en los parámetros de calidad de la canal y de la carne no pueden ser atribuidas solo a la mayor edad de los corderos. De

hecho, cuando se utilizó la edad como covariable, su efecto no fue significativo para los diferentes parámetros indicativos de la calidad nutritiva y organoléptica de la carne que han sido evaluados en el presente estudio. Por otra parte, los cambios observados en el perfil transcriptómico, proteómico y metabolómico, provocados por el diferente nivel de ingestión durante la lactancia, corroboran los resultados obtenidos.

Cabe destacar que se observaron cambios significativos en la composición química de la carne (músculo *longissimus thoracis*), con valores superiores de grasa en los animales restringidos durante la lactancia, así como diferencias en el perfil de ácidos grasos. Así, la carne procedente de los animales del grupo RES presentó un mayor contenido total de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), así como una mayor cantidad de ácidos grasos saturados totales (SFA) y monoinsaturados (MUFA). Por otro lado, no se observaron diferencias en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), localizados fundamentalmente en la membrana de las células, lo que indica que el aumento de grasa intramuscular en los animales del grupo RES fue resultado de una mayor acumulación de grasa dentro de los adipocitos, en lugar de un aumento del número de adipocitos.

Por otra parte, cuando comparamos la proporción de ácidos grasos respecto al total (figura 6), observamos una mayor proporción de ácidos grasos saturados en el grupo RES, así como una menor proporción de ácidos grasos poliinsaturados, mientras que los monoinsaturados se mantienen en la misma proporción en ambos grupos. Por ello, la proporción de PUFA respecto a SFA es mayor en el grupo ADL. Estos valores, por lo tanto, dieron lugar a índices más saturados para la grasa intramuscular del grupo RES.

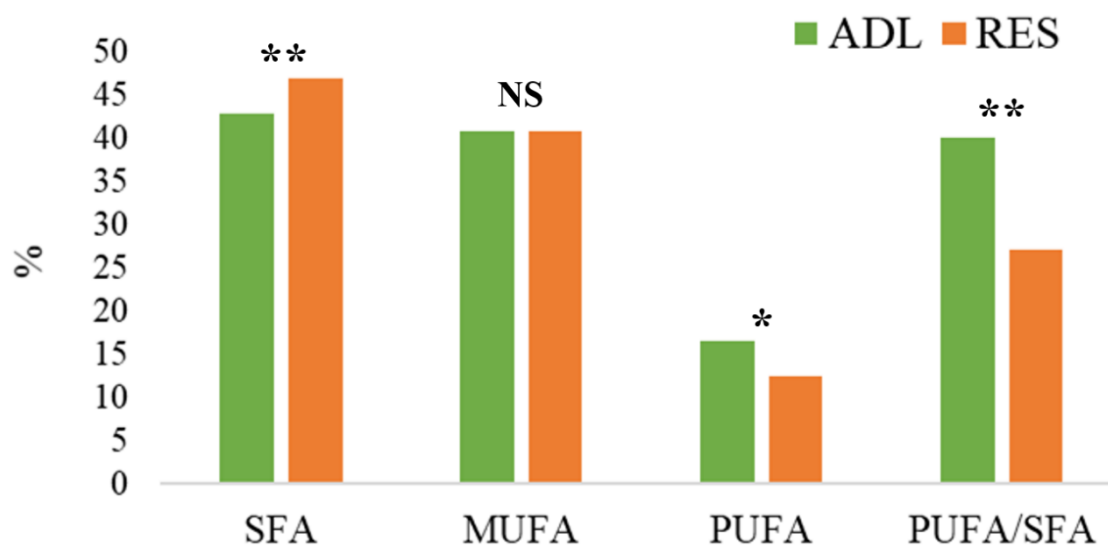


Figura 6. Proporción de los diferentes ácidos grasos de la carne respecto al total de ácidos grasos en el grupo *ad libitum* (ADL) y restringido (RES) (SFA = ácidos grasos saturados totales; MUFA = ácidos grasos monoinsaturados; PUFA = ácidos grasos poliinsaturados) (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; NS: $P > 0,05$).

Se ha demostrado que el marmoleado (grasa intramuscular) es uno de los factores más importantes que determinan la calidad de la carne, con un efecto positivo especialmente sobre la textura (terneza), la jugosidad, el sabor (flavor) y la palatabilidad general de la misma (Calkins y Sullivan, 2007; Du *et al.*, 2010; Nishimura, 2010; Corbin *et al.*, 2015). Sin embargo, en nuestro estudio, no se encontraron diferencias significativas en la textura de la carne entre los dos grupos experimentales. Este parámetro, al igual que el color, se ve modificado por la edad del animal (Beriaín *et al.*, 2000). No obstante, como ya se mencionó anteriormente, cuando se introdujo la edad de los animales como covariable, esta no fue significativa ($P > 0,05$).

Los resultados de composición química están en consonancia con los obtenidos en la determinación del perfil transcriptómico hepático (Exp. I), ya que se observó una menor expresión, en los animales del grupo RES, de genes implicados en la activación de ácidos grasos antes de que entren a la mitocondria (p. ej., *ACSM3*, *ACOT13*), pero también de uno de los genes relacionados con la fosforilación oxidativa y la cadena respiratoria (p. ej., *ND3*). Esto indica que la β -oxidación de ácidos grasos está disminuida en los animales del grupo restringido, favoreciendo, por tanto, la mayor acumulación de grasa intramuscular, omental y perirrenal observada en estos animales. Además, en los animales del grupo RES se observó una menor expresión de genes implicados en los procesos de desaturación para formar ácidos grasos poliinsaturados (p. ej., *ACOX3*, *FADS6*). Por su parte, el perfil proteómico y metabolómico también indicó una disminución en la β -oxidación de ácidos grasos. No obstante, es posible que se hayan producido también efectos en la biohidrogenación a nivel ruminal en estos animales, ya que el perfil de ácidos grasos del rumen (Capítulo III) también indica una mayor saturación de los ácidos grasos en los corderos RES en comparación con el grupo ADL.

Desde el punto de vista de la salud de los consumidores, los mayores niveles de CLA observados en el grupo restringido, con demostradas propiedades beneficiosas para la salud humana (efecto anticarcinógeno, antiteratógeno, cardioprotector; antihipertensivo, prevención de la diabetes y la obesidad, mejora de la función inmunitaria, etc.; Mulvihill, 2001; Koba y Yanagita, 2014) podrían hacer de la carne de

corderos restringidos una carne más saludable, a pesar de los mayores niveles de ácidos grasos saturados. Por otra parte, la mayor proporción de PUFA observada en el grupo ADL, más susceptibles a la peroxidación lipídica, podría reducir la vida útil de la carne durante su procesamiento y almacenamiento, debido a cambios de color y al desarrollo de olores y sabores indeseables, afectando la calidad de la misma (Elmore *et al.*, 1999). No obstante, en nuestro estudio no se observaron diferencias entre ambos grupos en los niveles de TBARS ni en el color de la carne de corderos sacrificados al final del periodo de cebo (Exp. I).

Estos resultados no concuerdan con los de Greenwood *et al.* (1998), quienes observaron que los corderos con un crecimiento restringido en la etapa posnatal (desde el nacimiento hasta los 20 kg de peso vivo) presentaban, durante esta fase de restricción, mayores cantidades de proteína y cenizas, y menor contenido en grasa y energía bruta, lo que se explica por la mayor prioridad del tejido magro sobre la grasa cuando el aporte de nutrientes es limitado (Greenwood *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2008). No obstante, en este trabajo los animales se evaluaron durante la fase de restricción alimentaria y no se sometieron a un periodo de realimentación, cuando las diferencias observadas podrían haber desaparecido. Además, como ya se ha comentado, si se proporciona una dieta altamente energética (concentrado) tras un periodo de restricción de alimento durante la lactancia, los animales con un crecimiento restringido podrían tener más cantidad de grasa, medida al mismo peso tras el destete (Greenwood y Cafe, 2007). Esto podría explicar las diferencias observadas en la composición corporal en el presente trabajo, que no estarían relacionadas, por tanto, con una mayor edad al sacrificio del grupo RES.

Establecimiento de la pubertad

En los últimos 50 años, numerosos estudios han investigado la asociación entre el nivel de ingestión, la ganancia diaria de peso y el inicio de la pubertad (Basarab *et al.*, 2012). El principal interés de adelantar la pubertad reside en disminuir el periodo improductivo de los animales de granja destinados a la cría, con el fin de reducir los costes económicos y aumentar la productividad de la explotación (Lawrence y Fowler, 2002; McDonald *et al.*, 2013).

En ovejas, la pubertad suele alcanzarse alrededor de los 7-8 meses de edad. El punto que determina este momento en cada individuo depende de la interacción de dos factores principales: el peso y la edad del animal (estado de desarrollo), y la época de

nacimiento (fotoperiodo). Esto significa que el grado de desarrollo necesario (aproximadamente entre un 60-65% del peso adulto) debe coincidir con la estación favorable de reproducción (finales de verano y otoño) (Jimeno *et al.*, 2001). Por ello, los animales nacidos en otoño, adquieren el peso apropiado durante el periodo de anestro (primavera-verano) y, por tanto, no alcanzan la pubertad hasta el otoño del año siguiente, cuando los días son más cortos (Foster, 1981; Foster *et al.*, 1985).

Como ya se ha comentado anteriormente, el nivel de alimentación de los animales jóvenes puede determinar la edad a la que alcanzan la pubertad. Respecto a los resultados obtenidos en el presente trabajo, a pesar de que las corderas no alcanzaron la pubertad debido a la época desfavorable de nacimiento (finales de verano; como ya se ha descrito en el capítulo V), se observó un retraso en la primera ovulación en las corderas restringidas durante la fase de lactancia (Exp II). En este sentido, se ha demostrado que el nivel de alimentación previo a la pubertad afecta la secreción de LH de la glándula pituitaria. Así, la restricción alimentaria de novillas prepúberes se caracteriza por una reducción de la secreción de LH y un retraso en el aumento de la frecuencia del pulso de LH asociada con el inicio de la pubertad (Basarab *et al.*, 2012).

El peso corporal es el principal regulador del inicio de la pubertad (Yelich *et al.*, 1995), de manera que, aunque se ha demostrado que las novillas con un menor nivel de ingestión alcanzan la pubertad a edades más avanzadas que aquellas con una adecuada ingestión de nutrientes, este momento se produce aproximadamente al mismo peso corporal (Basarab *et al.*, 2012). De hecho, en el presente trabajo, durante el 2º periodo posdestete, las corderas del grupo RES presentaron una GDP inferior a la registrada para el grupo ADL, además de un menor peso vivo al final del experimento, lo cual puede estar relacionado con el retraso en la primera ovulación observado en este grupo.

En cualquier caso, hay que tener en cuenta que la relación entre el ritmo de crecimiento, la edad y el peso vivo en el momento de la pubertad es muy compleja, y es prácticamente imposible separar el efecto del ritmo de crecimiento de los efectos del peso vivo o la edad. Por lo tanto, el inicio de la pubertad no tiene por qué ocurrir necesariamente a una edad constante, a un peso vivo fijo o en una época particular del año (Lawrence y Fowler, 2002).

Respecto a los mecanismos moleculares implicados en el proceso, se han encontrado varios genes y metabolitos que podrían explicar el retraso de la ovulación del

grupo RES. Como ya se ha mencionado en los artículos correspondientes, las corderas restringidas presentaron, durante el periodo posdestete de recría, una mayor acumulación de la PGE₂-biotina (cuya menor proporción con respecto a la PGF_{2α} es indispensable para que se produzca la ovulación en la oveja), así como una menor expresión del gen *STS* (implicado en la síntesis de hormonas esteroideas, como los estrógenos) y del gen *SPR* (que participa en la síntesis de folato) al final de la fase de lactancia.

Por último, en nuestro trabajo, no se observaron diferencias significativas en el RFI que puedan explicar el retraso en la primera ovulación del grupo RES. Sin embargo, serán necesarios más estudios que aclaren la relación entre la eficiencia alimentaria y la fertilidad, así como otros parámetros productivos como la producción de leche en el ganado ovino. En este sentido, se sabe que el nivel de alimentación durante las primeras semanas de vida de las terneras puede afectar el desarrollo de la glándula mamaria (Kaske *et al.*, 2010) y, por lo tanto, la futura producción de leche. Así, los estudios realizados en esta especie indican que el aumento del ritmo de crecimiento o el nivel de alimentación durante el periodo posnatal se asocia positivamente con la futura producción de leche (Drackley *et al.*, 2007; Bach, 2012).

Asimismo, en los siguientes trabajos será importante determinar el efecto de la restricción alimentaria durante la lactancia de los animales sobre el fenotipo de la descendencia, a través de las marcas epigenéticas. Las modificaciones en la nutrición materna pueden afectar no solo al perfil epigénético de la siguiente generación, sino a varias generaciones subsiguientes (Van Soom *et al.*, 2013; Chavatte-Palmer *et al.*, 2018), por lo que su conocimiento es imprescindible para el correcto diseño de los programas de selección. De hecho, es probable que la eficiencia alimentaria de la descendencia se pueda mejorar mediante el manejo nutricional de la madre (Meyer *et al.*, 2012; Gotoh, 2015).

Referencias

- ABOUHEIF, M., AL-OWAIMER, A., KRAIDEES, M., METWALLY, H. & SHAFEY, T. 2013. Effect of restricted feeding and realimentation on feed performance and carcass characteristics of growing lambs. *Revista Brasileira de Zootecnia* 42, 95-101.

- AL-HUSSEINI, W., GONDRO, C., QUINN, K., HERD, R.M., GIBSON, J.P. & CHEN, Y. 2014. Expression of candidate genes for residual feed intake in Angus cattle. *Animal Genetics* 45, 12-19.
- ALEXANDRE, P.A., KOGELMAN, L.J., SANTANA, M.H., PASSARELLI, D., PULZ, L.H., FANTINATO-NETO, P., SILVA, P.L., LEME, P.R., STREFEZZI, R.F., COUTINHO, L.L., FERRAZ, J.B., ELER, J.P., KADARMIDEEN, H.N. & FUKUMASU, H. 2015. Liver transcriptomic networks reveal main biological processes associated with feed efficiency in beef cattle. *BMC Genomics* 16, 1073.
- BACH, A. 2012. Ruminant Nutrition Symposium: Optimizing performance of the offspring: Nourishing and managing the dam and postnatal calf for optimal lactation, reproduction, and immunity. *Journal of Animal Science* 90, 1835-1845.
- BARKER, D.J.P. 2007. The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine* 261, 412-417.
- BASARAB, A., FITZSIMMONS, C., WHISNANT, C.S. & WETTEMANN, R.P. 2012. Interactions with other traits: Reproduction and fertility. *En: HILL, R.A. (ed.). Feed efficiency in the beef industry*. 1ª ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 123-144.
- BERIAIN, M.J., PURROY, A., TREACHER, T. & BAS, P. 2000. Effect of animal and nutritional factors and nutrition on lamb meat quality. *En: LEDIN, I. & MORAND-FEHR, P. (eds.). Sheep and goat nutrition: Intake, digestion, quality of products and rangelands*. Zaragoza: CIHEAM, 75-86.
- BOOTH, J.A. 2003. Effect of forage addition to the diet on rumen development in calves. Tesis doctoral, Iowa State University.
- BOTTJE, W.G., TANG, Z.X., IQBAL, M., CAWTHON, D., OKIMOTO, R., WING, T. & COOPER, M. 2002. Association of mitochondrial function with feed efficiency within a single genetic line of male broilers. *Poultry Science* 81, 546-555.
- CALKINS, C.R. & SULLIVAN, G. 2007. Ranking of beef muscles for tenderness. Beef facts: Product enhancement. National Cattlemen's Beef Association. Disponible Online:
https://www.beefresearch.org/CMDocs/BeefResearch/PE_Fact_Sheets/Ranking.pdf. [Consultado el 27/01/2020].

- CANTALAPIEDRA-HIJAR, G., ABO-ISMAIL, M., CARSTENS, G.E., GUAN, L.L., HEGARTY, R., KENNY, D.A., MCGEE, M., PLASTOW, G., RELING, A. & ORTIGUES-MARTY, I. 2018. Review: Biological determinants of between-animal variation in feed efficiency of growing beef cattle. *Animal* 12, s321-s335.
- CATON, J.S., BAUER, M.L. & HIDARI, H. 2000. Metabolic components of energy expenditure in growing beef cattle – review. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 13, 702-710.
- CHAVATTE-PALMER, P., VELAZQUEZ, M.A., JAMMES, H. & DURANTHON, V. 2018. Review: Epigenetics, developmental programming and nutrition in herbivores. *Animal* 12, s363-s371.
- CHEN, Y., ARTHUR, P.F., BARCHIA, I.M., QUINN, K., PARNELL, P.F. & HERD, R.M. 2012. Using gene expression information obtained by quantitative real-time PCR to evaluate Angus bulls divergently selected for feed efficiency. *Animal Production Science* 52, 1058-1067.
- CHEN, Y., GONDRO, C., QUINN, K., HERD, R.M., PARNELL, P.F. & VANSELOW, B. 2011. Global gene expression profiling reveals genes expressed differentially in cattle with high and low residual feed intake. *Animal Genetics* 42, 475-490.
- CONNOR, E.E., KAHL, S., ELSASSER, T.H., PARKER, J.S., LI, R.W., VAN TASSELL, C.P., BALDWIN, R.L. 6TH. & BARAO, S.M. 2010. Enhanced mitochondrial complex gene function and reduced liver size may mediate improved feed efficiency of beef cattle during compensatory growth. *Functional & Integrative Genomics* 10, 39-51.
- CORBIN, C.H., O'QUINN, T.G., GARMYN, A.J., LEGAKO, J.F., HUNT, M.R., DINH, T.T.N., RATHMANN, R.J., BROOKS, J.C. & MILLER, M.F. 2015. Sensory evaluation of tender beef strip loin steaks of varying marbling levels and quality treatments. *Meat Science* 100, 24-31.
- CRUZEN, S.M., HARRIS, A.J., HOLLINGER, K., PUNT, R.M., GRUBBS, J.K., SELSBY, J.T., LONERGAN, S.M. & HUFF-LONERGAN, E. 2013. Evidence of decreased muscle protein turnover in gilts selected for low residual feed intake. *Journal of Animal Science* 91, 4007-4016.

- DONKIN, S.S. & HAMMON, H. 2005. Hepatic gluconeogenesis in developing ruminants. *En: BURRIN, D.G. & MERSMANN, H.J. (eds.). Biology of metabolism in growing animals.* Londres: Elsevier, 375-390.
- DRACKLEY, J.K., POLLARD, B.C., DANN, H.M. & STAMEY, J.A. 2007. First-lactation milk production for cows fed control or intensified milk replacer programs as calves. *Journal of Dairy Science* 90(Suppl. 1), 614. (Abstr.).
- DU, M., TONG, J., ZHAO, J., UNDERWOOD, K.R., ZHU, M., FORD, S.P. & NATHANIELSZ, P.W. 2010. Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *Journal of Animal Science* 88(E. Suppl.), E51-E60.
- ELMORE, J.S., MOTTRAM, D.S., ENSER, M. & WOOD, J.D. 1999. Effect of the polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1619-1625.
- FERRELL, C.L. & KOONG, K.J. 1987. Influence of plane of nutrition on body composition, organ size and energy utilization of sprague-dawley rats. *Journal of Nutrition* 116, 2525-2535.
- FILLMORE, N., MORI, J. & LOPASCHUK, G.D. 2014. Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. *British Journal of Pharmacology* 171, 2080-2090.
- FITZSIMONS, C., KENNY, D.A., FAHEY, A.G. & MCGEE, M. 2014. Visceral organ weights, digestion and carcass characteristics of beef bulls differing in residual feed intake offered a high concentrate diet. *Animal* 8, 949-959.
- FITZSIMONS, C., MCGEE, M., KEOGH, K., WATERS, S.M. & KENNY, D.A. 2017. Molecular physiology of feed efficiency in beef cattle. *En: SCANES, C.G. & HILL, R.A. (eds.). Biology of domestic animals.* Boca Raton, Florida: CRC Press, 120-163.
- FOSTER, D.L. 1981. Mechanism for delay of first ovulation in lambs born in the wrong season (fall). *Biology of Reproduction* 25, 85-92.
- FOSTER, D.L., YELLON, S.M. & OLSTER, D.H. 1985. Internal and external determinants of the timing of puberty in the female. *Journal of Reproduction and Fertility* 75, 327-344.

- FRUTOS, J., ANDRÉS, S., TREVISI, E., BENAVIDES, J., SANTOS, N., SANTOS, A. & GIRÁLDEZ, F.J. 2018a. Moderated milk replacer restriction of ewe lambs alters gut immunity parameters during the pre-weaning period and impairs liver function and animal performance during the replacement phase. *Animal Feed Science and Technology* 243, 80-89.
- FRUTOS, J., ANDRÉS, S., TREVISI, E., YÁÑEZ-RUIZ, D.R., SECUNDINO LÓPEZ, S., SANTOS, A. & GIRÁLDEZ, F.J. 2018b. Early feed restriction programs metabolic disorders in fattening merino lambs. *Animals* 8, 83.
- GALVANI, D.B., PIRES, C.C., HÜBNER, C.H., CARVALHO, S. & WOMMER, T.P. 2014. Growth performance and carcass traits of early-weaned lambs as affected by the nutritional regimen of lactating ewes. *Small Ruminant Research* 120, 1-5.
- GOTOH, T. 2015. Potential of the application of epigenetics in animal production. *Animal Production Science* 55, 145-158.
- GREENWOOD, P.L. & CAFE, L.M. 2007. Prenatal and pre-weaning growth and nutrition of cattle: long-term consequences for beef production. *Animal* 1, 1283-1296.
- GREENWOOD, P.L., CAFÉ, L.M., HEARNSHAW, H. & HENNESSY, D.W. 2005. Consequences of nutrition and growth retardation early in life for growth and composition of cattle and eating quality of beef. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia* 15, 183-195.
- GREENWOOD, P.L., HUNT, A.S., HERMANSON, J.W. & BELL, A.W. 1998. Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: I. Body growth and composition, and some aspects of energetic efficiency. *Journal of Animal Science* 76, 2354-2367.
- GREENWOOD, P.L., HUNT, A.S., SLEPETIS, R.M., FINNERTY, K.D., ALSTON, C., BEERMANN, D.H. & BELL, A.W. 2002. Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: III. Regulation of energy metabolism. *Journal of Animal Science* 80, 2850-2861.
- HARVEY, P.A. & LEINWAND, L.A. 2011. The cell biology of disease cellular mechanisms of cardiomyopathy. *The Journal of Cell Biology* 194, 355–365.

- HERD, R.M. & ARTHUR, P.F. 2009. Physiological basis for residual feed intake. *Journal of Animal Science* 87(14 Suppl.), E64-E71.
- HORNICK, J.L., VAN EENAEME, C., GÉRARD, O., DUFRASNE, I. & ISTASSE, L. 2000. Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domestic Animal Endocrinology* 19, 121-132.
- JIMENO, V., CASTRO, T. & REBOLLAR, P.G. 2001. Interacción Nutrición-Reproducción en Ovino de Leche. *Ganadería* 11, 30-42.
- KASKE, M., WIEDEMANN, S. & KUNZ, H.-J. 2010. Metabolic programming: Background and potential impact for dairy cattle. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 79, 445-451.
- KENNY, D.A., FITZSIMONS, C., WATERS, S.M. & MCGEE, M. 2018. Invited review: Improving feed efficiency of beef cattle – the current state of the art and future challenges. *Animal* 12, 1815-1826.
- KLEIN, S., SAKURAI, Y., ROMIJN, J.A. & CARROLL, R.M. 1993. Progressive alterations in lipid and glucose metabolism during short-term fasting in young adult men. *The American Journal of Physiology* 265(5 Pt 1), E801-E806.
- KOBA, K. & YANAGITA, T. 2014. Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). *Obesity Research & Clinical Practice* 8, e525-e532.
- KOLATH, W.H., KERLEY, M.S., GOLDEN, J.W. & KEISLER, D.H. 2006. The relationship between mitochondrial function and residual feed intake in Angus steers. *Journal of Animal Science* 84, 861-865.
- KUHLA, B., ALBRECHT, D., KUHLA, S. & METGES, C.C. 2009. Proteome analysis of fatty liver in feed-deprived dairy cows reveals interaction of fuel sensing, calcium, fatty acid, and glycogen metabolism. *Physiological Genomics* 37, 88-98.
- LANCASTER, P.A., CARSTENS, G.E., MICHAL, J.J., BRENNAN, K.M., JOHNSON, K.A. & DAVIS, M.E. 2014. Relationships between residual feed intake and hepatic mitochondrial function in growing beef cattle. *Journal of Animal Science* 92, 3134-3141.
- LAWRENCE, T.L.J. & FOWLER, V.R. 2002. Growth of farm animals. 2^a ed. Wallingford: CABI Publishing, 384 p.

- LUCAS, A. 1998. Programming by early nutrition: An experimental approach. *The Journal of Nutrition* 128(2 Suppl.), 401S-406S.
- MADAN, K., BHARDWAJ, P., THAREJA, S., GUPTA, S.D. & SARAYA, A. 2006. Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Journal of Clinical Gastroenterology* 40, 930-935.
- MARÍN-GARCÍA, J. & GOLDENTHAL, M.J. 2002. Fatty acid metabolism in cardiac failure: biochemical, genetic and cellular analysis. *Cardiovascular Research* 54, 516-527.
- MAYES, P.A. 1996. Gluconeogenesis and control of the blood glucose. *En: MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A. & RODWELL, V.W. (eds.). Harper's Biochemistry*. 24^a ed. Stamford, CT: Appleton & Lange, 194-204.
- MCDONALD, P., EDWARDS, R.A., GREENHALGH, J.F.D., MORGAN, C.A., SINCLAIR, L.A. & WILKINSON, R.G. 2013. *Nutrición Animal*. 7^a ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 672 p.
- MEYER, A.M., CATON, J.S., HESS, B.W., FORD, S.P. & REYNOLDS, L.P. 2012. Epigenetics and effects on the neonate that may impact feed efficiency. *En: Hill, R.A. (ed.). Feed efficiency in the beef industry*. 1^a ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 199-223.
- MEYER, A.M., HESS, B.W., PAISLEY, S.I., DU, M. & CATON, J.S. 2014. Small intestinal growth measures are correlated with feed efficiency in market weight cattle, despite minimal effects of maternal nutrition during early to midgestation. *Journal of Animal Science* 92, 3855-3867.
- MEYERS, D.E., BASHA, H.I. & KOENIG, M.K. 2013. Mitochondrial cardiomyopathy, pathophysiology, diagnosis, and management. *Texas Heart Institute Journal* 40, 385-394.
- MONTANHOLI, Y., FONTOURA, A., SWANSON, K., COOMBER, B., YAMASHIRO, S. & MILLER, S. 2013. Small intestine histomorphometry of beef cattle with divergent feed efficiency. *Acta Veterinaria Scandinavica* 55, 9.
- MORRIS, S.M. JR. 1992. Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis. *Annual Review of Nutrition* 12, 81-101.

- MULVIHILL, B. 2001. Ruminant meat as a source of conjugated linoleic acid (CLA). *Nutrition Bulletin* 26, 295-299.
- MURPHY, T.A. & LOERCH, S.C. 1994. Effects of restricted feeding of growing steers on performance, carcass characteristics, and composition. *Journal of Animal Science* 72, 2497-2507.
- NAFIKOV, R.A. & BEITZ, D.C. 2007. Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals. *The Journal of Nutrition* 137, 702-705.
- NETTER, K.J. 2002. The role of nutrients in detoxification mechanisms. *En: KOTSONIS, F.N. & MACKEY, M.A. (eds.). Nutritional Toxicology. 2ª ed. Londres: CRC Press, 54-74.*
- NISHIMURA, T. 2010. The role of intramuscular connective tissue in meat texture. *Animal Science Journal* 81, 21-27.
- OWENS, F.N., GILL, D.R., SECRIST, D.S. & COLEMAN, S.W. 1995. Review of some aspects of growth and development of feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 73, 3152-3172.
- PARADIS, F., YUE, S., GRANT, J.R., STOTHARD, P., BASARAB, J.A. & FITZSIMMONS, C. 2015. Transcriptomic analysis by RNA sequencing reveals that hepatic interferon-induced genes may be associated with feed efficiency in beef heifers. *Journal of Animal Science* 93, 3331-3341.
- RANDALL, D., BURGGREN, W. & FRENCH, K. 1998. Fisiología animal. Mecanismos y adaptaciones. 4ª ed. Madrid: McGraw-Hill, 795 p.
- RHOADS, R.P., GREENWOOD, P.L., BELL, A.W. & BOISCLAIR, Y.R. 2000a. Organization and regulation of the gene encoding the sheep acid-labile subunit of the 150-kilodalton insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology* 141, 1425-1433.
- RHOADS, R.P., GREENWOOD, P.L., BELL, A.W. & BOISCLAIR, Y.R. 2000b. Nutritional regulation of the genes encoding the acid-labile subunit and other components of the circulating insulin-like growth factor system in the sheep. *Journal of Animal Science* 78, 2681-2689.

- RODRÍGUEZ, A.B., LANDA, R., BODAS, R., PRIETO, N., MANTECÓN, A.R. & GIRÁLDEZ, F.J. 2008. Carcass and meat quality of Assaf milk fed lambs: Effect of rearing system and sex. *Meat Science* 80, 225-230.
- RODRÍGUEZ, R., SOSA, A. & RODRÍGUEZ, Y. 2007. La síntesis de proteína microbiana en el rumen y su importancia para los rumiantes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 41, 303-311.
- SAMI, A.S., AUGUSTINI, C. & SCHWARZET, F.J. 2004. Effects of feeding intensity and time on feed on performance, carcass characteristics and meat quality of Simmental bulls. *Meat Science* 67, 195-201.
- SHARIFABADI, H.R., ZAMIRI, M.J., ROWGHANI, E. & BOTTJE, W.B. 2012. Relationship between the activity of mitochondrial respiration chain complexes and feed efficiency in fat-tailed Ghezel lambs. *Journal of Animal Science* 90, 1807-1815.
- SOBERON, F., RAFFRENATO, E., EVERETT, R.W. & VAN AMBURGH, M.E. 2012. Prewaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves. *Journal of Dairy Science* 95, 783-793.
- SOETERS, M.R., SOETERS, P.B., SCHOONEMAN, M.G., HOUTEN, S.M. & ROMIJN, J.A. 2012. Adaptive reciprocity of lipid and glucose metabolism in human short-term starvation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 303, E1397-E1407.
- SOHN, O.S. & FIALA, E.S. 1995. Effects of dietary restriction and fasting on selected rat liver enzymes of xenobiotic metabolism and on AOM-induced DNA guanine methylation in rat liver and colon. *Nutrition and Cancer* 23, 13-22.
- STOTT, W.T., KAN, H.L., MCFADDEN, L.G., SPARROW, B.R. & GOLLAPUDI, B.B. 2004. Effect of strain and diet upon constitutive and chemically induced activities of several xenobiotic-metabolizing enzymes in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39, 325-333.
- THOMSON, E.F., BICKEL, H. & SCHÜRCH, A. 1982. Growth performance and metabolic changes in lambs and steers after mild nutritional restriction. *The Journal of Agricultural Science* 98, 183-194.

- TILLMAN, J.B., DHAHBI, J.M., MOTE, P.L., WALFORD, R.L. & SPINDLER, S.R. 1996. Dietary calorie restriction in mice induces carbamyl phosphate synthetase I gene transcription tissue specifically. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 3500-3506.
- TIZIOTO, P.C., COUTINHO, L.L., DECKER, J.E., SCHNABEL, R.D., ROSA, K.O., OLIVEIRA, P.S.N., SOUZA, M.M., MOURÃO, G.B., TULLIO, R.R., CHAVES, A.S., LANNA, D.P.D., ZERLOTINI-NETO, A., MUDADU, M.A., TAYLOR, J.F. & REGITANO, L.C.A. 2015. Global liver gene expression differences in Nelore steers with divergent residual feed intake phenotypes. *BMC Genomics* 16, 242.
- TIZIOTO, P.C., COUTINHO, L.L., OLIVEIRA, P.S.N., CESAR, A.S.M., DINIZ, W.J.S., LIMA, A.O., ROCHA, M.I., DECKER, J.E., SCHNABEL, R.D., MOURÃO, G.B., TULLIO, R.R., ZERLOTINI, A., TAYLOR, J.F. & REGITANO, L.C.A. 2016. Gene expression differences in *Longissimus* muscle of Nelore steers genetically divergent for residual feed intake. *Scientific Reports* 6, 39493.
- TUDOR, G.D. & O'ROURKE, P.K. 1980. The effect of pre- and post-natal nutrition on the growth of beef cattle. II. The effect of severe restriction in early postnatal life on growth and feed efficiency during recovery. *Australian Journal of Agricultural Research* 31, 179-189.
- VAN SOOM, A., VANDAELE, L., GOOSSENS, K., HERAS, S., WYDOOGHE, E., RAHMAN, M.B., KAMAL, M.M., VAN EETVELDE, M., OPSOMER, G. & PEELMAN L. 2013. Epigenetics and the periconception environment in ruminants. *Proceedings of the Belgian Royal Academies of Medicine* 2, 1-23.
- VELEZ, J.C. & DONKIN, S.S. 2005. Feed restriction induces pyruvate carboxylase but not phosphoenolpyruvate carboxykinase in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88, 2938-2948.
- WAJNER, M. & AMARAL, A.U. 2016. Mitochondrial dysfunction in fatty acid oxidation disorders: insights from human and animal studies. *Bioscience Reports* 36, e00281.

- YELICH, J.V., WETTEMANN, R.P., DOLEZAL, H.G., LUSBY, K.S., BISHOP, D.K. & SPICER L.J. 1995. Effect of growth rate on carcass composition and lipid partitioning at puberty and growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin, and metabolites before puberty in beef heifers. *Journal of Animal Science* 73, 2390-2405.
- YOUNG, J.W. 1977. Gluconeogenesis in cattle: significance and methodology. *Journal of Dairy Science* 60, 1-15.

CONCLUSIONES

1. La restricción de alimento durante la fase de lactancia de corderos tiene un efecto negativo a corto plazo sobre la eficiencia alimentaria de corderos en la fase de cebo, pero no a medio plazo en la fase de recría de corderas. El diferente comportamiento a corto y medio plazo podría estar relacionado con el diferente nivel de restricción en la fase de lactancia y con el diferente tipo de dieta utilizada en las fases posdestete.
2. La alimentación restringida en corderos lactantes induce cambios en la morfología del tracto gastrointestinal, pero no modifica la digestibilidad, la microbiota del contenido gastrointestinal, ni los parámetros de fermentación en el rumen.
3. La restricción alimentaria durante la lactancia promueve modificaciones en la expresión génica y el perfil proteómico a nivel hepático y en el perfil metabolómico plasmático, que perduran en el tiempo. Estos cambios están relacionados principalmente con el metabolismo lipídico y proteico, con una mayor actividad de las rutas gluconeogénicas en los animales restringidos.
4. La restricción de alimento durante la fase de lactancia promueve a corto plazo (cebo) una mayor acumulación de grasa en los depósitos de la canal y de la no canal de los corderos, así como diferencias en el perfil de ácidos grasos de la carne, sin que se vean afectados el resto de parámetros relacionados con la calidad de la canal y de la carne.
5. La ingestión de cantidades restringidas de lactorreemplazante en corderas tiene un efecto negativo a medio plazo sobre el establecimiento de la pubertad, que se retrasa en los animales restringidos como consecuencia de un menor crecimiento que no se compensa tras el periodo de restricción, y de una menor expresión de genes relacionados con la función reproductiva.

CONCLUSIONS

1. Early feed restriction during the suckling period of lambs has a short-term negative effect on lamb feed efficiency during the fattening period, but not in the medium term during the replacement period. The different behavior in the short and medium term could be related to the different level of restriction in the suckling period and to the different type of diet used in the postweaning phases.
2. Restricted feeding in suckling lambs induces changes in the gastrointestinal morphology, but does not modify the digestibility, the microbiota of the gastrointestinal content, or the ruminal fermentation parameters.
3. Early feed restriction during the suckling period promotes modifications in gene expression and proteomic profile at the hepatic level, and in plasma metabolomic profile. These changes are kept over time and are mainly related to lipid and protein metabolism, with an increased activity of gluconeogenic pathways in restricted animals.
4. Early feed restriction during the suckling period promotes a short-term (fattening period) greater fat accretion in carcass and non-carcass depots of lambs, as well as differences in the meat fatty acid profile. However, there are no effects on the rest of carcass and meat quality traits.
5. Restricted milk replacer intake in female lambs has a negative medium-term effect on puberty onset, which is delayed in restricted animals as a result of a slower growth not compensated after the restricted period, and a down-regulation of genes related to reproductive function.

