



universidad
de león



TESIS DOCTORAL

Efecto de la alimentación en la fase de lactancia sobre la eficiencia de utilización del alimento en el período posdestete y su relación con la microbiota del tracto digestivo, el estatus oxidativo e inmunológico en el ganado ovino

Javier De Frutos Vidal

Ciencias veterinarias y de los alimentos

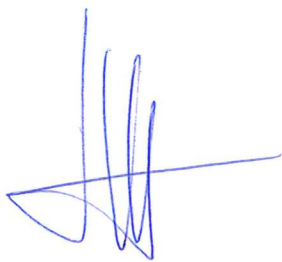
Directores: F. Javier Giráldez García
y Sonia Andrés Llorente

Tutora: Carmen Valdés Solís

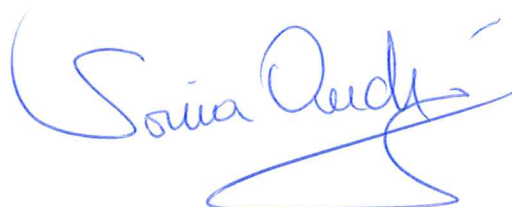
León, 2019

Los doctores Francisco Javier Giráldez García y Sonia Andrés Llorente, como directores de la tesis doctoral titulada “Efecto de la alimentación en la fase de lactancia sobre la eficiencia de utilización del alimento en el período posdestete y su relación con la microbiota del tracto digestivo, el estatus oxidativo e inmunológico en el ganado ovino” realizada por Javier De Frutos Vidal, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Firmado en León, a 15 de marzo de 2019



Francisco Javier Giráldez García



Sonia Andrés Llorente

El autor de esta tesis doctoral ha disfrutado de contratos de trabajo financiados por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Proyecto Intramural Especial; proyecto 201540E084) y por la Universidad de León (Ayudas Puente Formativas).

Los trabajos que componen esta tesis doctoral han sido financiados por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (AGL2014-54124R y BFU2014-57964-R).

Agradecimientos

Una tesis doctoral podría equipararse en términos de navegación a un viaje transatlántico, repleto de aventuras y amenazantes icebergs. Para completar esta delicada travesía he contado con la ayuda de una numerosa tripulación.

Mi tutora, Carmen Valdés, fue la primera persona que me tendió la mano para subirme al barco. Al mando del mismo figuraban Sonia Andrés y F. Javier Giráldez, que con su dedicación y experiencia posibilitaron que la tesis no zozobrase ante las adversidades y llegase a buen puerto.

Miguel Fernández me acogió como su grumete favorito y me enseñó, además de veterinaria, otros conocimientos aplicables a la vida misma. Julio Benavides también me ofreció generosamente su ayuda en los aspectos de la tesis más relacionados con la sanidad animal.

El personal de la finca y del laboratorio del Instituto de Ganadería de Montaña, junto con los estudiantes mexicanos de prácticas, constituyeron un apoyo inestimable durante la realización de las pruebas experimentales.

Mientras avanzaba mi largo viaje, conocí a muchos compañeros que habían embarcado en circunstancias similares a las mías. Trabé amistad con la mayoría y me siento muy afortunado de haber compartido alegres veladas con ellos en el barrio húmedo.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia y a mis amigos de Salamanca la inconmensurable energía que me han transmitido a lo largo de estos años. Representan el faro que alumbró mi vida incluso en los periodos de mayor oscuridad. Mención especial se merece mi abuela Maruca, que hasta en las fases más avanzadas de su enfermedad no dejó de interesarse por mi trabajo con los *corderitos* y ahora me orienta desde las estrellas.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	9
Objetivos.....	15
Revisión bibliográfica.....	19
1. Eficiencia alimentaria.....	21
1.1. Definición y concepto.....	21
1.2. Medidas de eficiencia alimentaria.....	21
1.3. Factores que afectan a la eficiencia alimentaria.....	23
2. Respuesta inmunitaria.....	27
2.1. Definición y concepto.....	27
2.2. Respuesta inmunitaria innata.....	27
2.3. Respuesta inmunitaria adquirida.....	32
2.4. Respuesta inmunitaria a nivel de las mucosas.....	34
2.5. Factores que influyen en la respuesta inmunitaria.....	36
2.5.1. Microbiota comensal.....	36
2.5.2. Estrés agudo y estrés crónico.....	37
2.5.3. Estrés oxidativo.....	38
2.5.4. Restricción alimentaria en la gestación.....	40
2.5.5. Restricción alimentaria en la lactancia.....	41
2.5.5.1. Efectos sobre la inmunidad innata.....	44

2.5.5.2. Efectos sobre la inmunidad celular	45
2.5.5.3. Efectos sobre la inmunidad humoral	46
3. Origen de la salud y la enfermedad durante el desarrollo (DOHaD).....	48
3.1. Definición y concepto	48
3.2. Restricción alimentaria en la gestación	50
3.2.1. Efectos sobre el metabolismo energético.....	50
3.2.2. Efectos sobre la respuesta inmunitaria.....	54
3.3. Restricción alimentaria en la lactancia	55
3.3.1. Efectos sobre el metabolismo energético y proteico	56
3.3.2. Efectos sobre la función hepática y el estrés oxidativo.....	60
3.3.3. Efectos sobre la respuesta inmunitaria	63
4. Fermentación en el rumen y acidosis ruminal.....	64
4.1. Acidosis aguda	65
4.2. Acidosis subaguda.....	65
4.3. Alteraciones y lesiones provocadas por la acidosis	67
4.4. Factores que influyen en la susceptibilidad a la acidosis	69
4.5. Microbiota epimural y DOHaD	71
Capítulo I	97
Capítulo II.....	107
Capítulo III.....	119
Capítulo IV	125
Capítulo V.....	137

Discusión general	141
Conclusiones.....	159

Abreviaciones

ACTH	adrenocorticotropic hormone / hormona adrenocorticotropa
ADG	average daily gain / ganancia media diaria
ADL	<i>ad libitum</i>
APP-	negative acute phase proteins / proteínas de fase aguda negativas
APP+	positive acute phase proteins / proteínas de fase aguda positivas
BHB	beta-hydroxybutyrate / beta-hidroxibutirato
CK18	cytokeratin 18 / citoqueratina 18
DOHaD	developmental origins of health and disease / origen de la salud y la enfermedad durante el desarrollo
FRAP	ferric reducing ability of plasma / potencial reductor férrico
GALT	gut-associated lymphoid tissue / tejido linfoide asociado al intestino
GPx	glutathione peroxidase / glutatión peroxidasa
HPA	hypothalamic–pituitary–adrenal / hipotalámico-hipofisario-adrenal
IFN-γ	interferon gamma / interferón gamma
Ig	immunoglobulin / inmunoglobulina
IGF-I	insulin growth factor I / factor de crecimiento insulínico tipo I
IL	interleukin / interleuquina
MDA	malondialdehyde / malondialdehído
MMW	metabolic mid-test weight / peso metabólico medio

NEFA	non-sterified fatty acids / ácidos grasos no esterificados
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns / patrones moleculares asociados a patógenos
PP	Peyer's patches / placas de Peyer
RES	restricted / restringido
RFI	residual feed intake / consumo residual de alimento
RG	residual body weight gain / ganancia residual de peso
ROS	reactive oxygen species / especies reactivas de oxígeno
SOD	superoxide dismutase / superóxido dismutasa
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances / especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
TGF-β	transforming growth factor beta / factor de crecimiento transformante beta
TLRs	Toll-like receptors / receptores tipo Toll
TNF-α	tumor necrosis factor alpha / factor de necrosis tumoral alfa

RESUMEN

En los últimos años ha disminuido significativamente el censo de ovino en nuestro país, reduciéndose el número de explotaciones y, de forma muy acusada, la producción de carne. Aunque en este declive han intervenido diversos factores que han condicionado la rentabilidad del sector, el coste de la alimentación del ganado es uno de los más importantes.

Para revertir esta tendencia, es importante identificar los mecanismos subyacentes que regulan la eficiencia alimentaria en la especie ovina. Uno de los factores que puede afectar a la eficiencia alimentaria de los corderos es la alimentación recibida en la fase de lactancia, ya que en este momento tiene lugar la colonización bacteriana de las mucosas del tracto gastrointestinal. Durante la lactancia se produce una compleja interacción a nivel de las mucosas entre los nutrientes, la microbiota comensal y el sistema inmunitario inmaduro del animal. Sin embargo, se desconoce si la restricción de alimento en esta etapa inicial de la vida de los corderos puede alterar el establecimiento de la microbiota epimural y el desarrollo del sistema inmunitario, afectando a la eficiencia alimentaria y a la susceptibilidad a desarrollar alteraciones de origen nutricional como la acidosis ruminal.

Además, aunque en la especie humana se ha descrito que la restricción de alimento en etapas tempranas de la vida puede favorecer la aparición de trastornos metabólicos en la edad adulta, no existen estudios en ganado ovino que hayan valorado si la restricción durante la lactancia puede predisponer a padecer alteraciones metabólicas en las fases de cebo y recría que perjudiquen a la eficiencia alimentaria.

Por todo ello, se planteó este trabajo de investigación, cuyo objetivo general ha sido estudiar el efecto de la restricción alimentaria de corderos durante la fase de lactancia con el fin de identificar algunas de las causas subyacentes a una baja eficiencia alimentaria

(alteraciones en el sistema inmunitario, la microbiota epimural y el metabolismo) en las fases de cebo y recría.

Para abordar este objetivo se llevaron a cabo dos pruebas experimentales, cuyos resultados han sido presentados en cinco publicaciones científicas, que conforman los cinco capítulos de los que se compone esta memoria.

El **capítulo I** se corresponde con el artículo titulado “*Early feed restriction of lambs modifies ileal epimural microbiota and affects immunity parameters during the fattening period*”. En la prueba experimental se emplearon 24 corderos machos de raza merina con un peso vivo inicial de $4,81 \pm 0,256$ kg y se asignaron al azar a uno de los dos grupos experimentales (12 animales por tratamiento) en función de la alimentación recibida durante la lactancia. El grupo *ad libitum* (ADL) se crió permanentemente con las madres, mientras que el grupo restringido (RES) se sometió a una restricción de alimento separándose 9 horas diarias de sus madres. Después del destete, a los 15 kg de peso vivo, todos los corderos se alojaron en jaulas individuales, se alimentaron con un pienso completo granulado con el mismo nivel de ingestión (35 g/kg de peso vivo al día) y se sacrificaron cuando alcanzaron los 27 kg de peso vivo. Se tomaron muestras de la pared del íleon para estudiar la comunidad bacteriana epimural, evaluar diversos parámetros inmunitarios locales y realizar un análisis morfométrico a nivel microscópico. Los corderos del grupo RES presentaron un índice de conversión más bajo que el grupo ADL durante el periodo de cebo ($P < 0,001$). Se detectó una mayor abundancia de *Prevotella spp.* adherida a la mucosa del íleon ($P < 0,05$) y un mayor número de linfocitos B y T infiltrados en la lámina propia ($P < 0,05$) en los corderos que habían estado restringidos durante la lactancia. También se observó que el grupo RES tenía unas células M teñidas con mayor intensidad en el epitelio ($P < 0,05$), una mayor concentración de inmunoglobulina A secretada (IgA, $P < 0,05$) y una submucosa más gruesa ($P = 0,057$). La

restricción alimentaria durante la lactancia se asoció con una menor expresión génica de varios receptores tipo Toll (TLRs) y del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) ($P < 0,05$).

En el estudio descrito en el **capítulo II** (artículo titulado “*Early feed restriction programs metabolic disorders in fattening merino lambs*”), se utilizaron los mismos corderos y tratamientos que se describieron en el capítulo anterior. En tres momentos distintos del periodo experimental (lactancia, predestete y cebo) se tomaron muestras de sangre a primera hora de la mañana para determinar las concentraciones de IgA y de diversos parámetros bioquímicos. Además, en el periodo de cebo se obtuvieron muestras de sangre para cuantificar las poblaciones de linfocitos. Después del sacrificio se recogieron muestras de la pared ruminal para estudiar la microbiota epimural, el color de la mucosa, la expresión génica de TLRs y citoquinas, medir la concentración de IgA y realizar un análisis morfométrico de las papilas a nivel microscópico. También se tomaron muestras de hígado para cuantificar las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). La restricción temprana de alimento no afectó a las poblaciones de linfocitos sanguíneos ni a la concentración plasmática de IgA ($P > 0,10$). Los corderos del grupo RES presentaron concentraciones plasmáticas más elevadas de ceruloplasmina, colesterol y superóxido dismutasa, así como concentraciones más bajas de insulina y bilirrubina que el grupo ADL ($P < 0,05$). Los valores de TBARS en el hígado fueron más bajos en los corderos que habían estado restringidos durante la lactancia ($P < 0,05$). No se observaron diferencias entre los dos grupos experimentales en la microbiota epimural del rumen, la expresión génica de TLRs y citoquinas, la concentración de IgA ni en el color de la mucosa o en los parámetros morfométricos de las papilas ($P > 0,05$).

En el **capítulo III**, que se corresponde con la publicación titulada “*Feed restriction in early life modifies the colonic epimural bacterial community and feed efficiency traits*”

during the fattening period of merino lambs”, se utilizaron los mismos animales y tratamientos que en los capítulos I y II. Después del sacrificio, a los 27 kg de peso, se tomaron muestras de la pared del colon para estudiar la comunidad bacteriana epimural, determinar la expresión génica de los TLRs, cuantificar la IgA secretada y realizar un recuento de los linfocitos B y T infiltrados en la lámina propia. Durante el periodo de cebo, cuando todos los corderos mantenían el mismo nivel de ingestión (35 g/kg de peso vivo al día), se observó un menor índice de conversión para el grupo RES ($P < 0,001$). Además, se detectó un incremento en la abundancia relativa del género *Prevotella* y una disminución del phylum *Proteobacteria* en la microbiota epimural del colon del grupo RES ($P < 0,05$). Sin embargo, la restricción temprana de alimento no afectó localmente a la concentración de IgA secretada, al número de linfocitos B y T infiltrados en la lámina propia ni a la expresión génica de TLRs ($P > 0,05$).

El **capítulo IV** se corresponde con el artículo titulado “*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*”. En esta segunda prueba experimental se utilizaron 40 corderas de raza assaf con un peso vivo inicial de $4,73 \pm 0,116$ kg. Los animales se alojaron en jaulas individuales y se dividieron al azar en dos grupos experimentales compuestos por 20 corderas cada uno. El primer grupo se alimentó con lactorreemplazante de manera *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 para crecer a un ritmo medio de 120 g/día. A los 35 días de edad se sacrificaron 8 corderas representativas de cada grupo y se tomaron muestras de la pared del íleon. El resto de las corderas se destetaron progresivamente, partiendo el grupo ADL de un peso de 13,5 kg y el grupo RES de 11,5 kg o 70 días de edad. Después del destete, todas las corderas 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 una ración completa hasta los 7,5 meses de edad. Durante la lactancia (1 mes de edad) y una vez que las corderas se estaban alimentando exclusivamente con la ración completa (5 y 7,5 meses de edad) se tomaron muestras de sangre a primera hora de la mañana para la determinación de diversos parámetros bioquímicos. La ingestión restringida de lactorreemplazante no promovió diferencias en la comunidad bacteriana epimural del íleon durante la lactancia ($P>0,05$). No obstante, las corderas lactantes del grupo RES presentaron mayores porcentajes de linfocitos T ($CD4^+$, $CD8^+$ y $WC1^+$) y una mayor concentración de IgA secretada en el íleon ($P<0,05$). La alimentación restringida durante la lactancia artificial redujo el grosor de la submucosa del íleon ($P<0,05$) y la intensidad de tinción de las células M en el epitelio ($P<0,1$). Asimismo, en el íleon de las corderas lactantes del grupo RES se observó una disminución en la expresión génica de varios TLRs y citoquinas antiinflamatorias (interleuquina 10 y TGF- β) y un aumento en la expresión de la citoquina proinflamatoria interferón gamma ($P<0,05$). Se detectó una disminución en las concentraciones plasmáticas de varios parámetros relacionados con el metabolismo energético (ácidos grasos no esterificados, beta-hidroxibutirato, colesterol), proteico (urea, creatinina, proteína total) y el estatus oxidativo (paraoxonasa, capacidad antioxidante total) en el grupo RES únicamente durante el periodo de restricción ($P<0,05$). En cambio, los niveles plasmáticos de albúmina y de gamma glutamil transferasa persistieron disminuidos en las corderas del grupo RES durante la fase de recría ($P<0,05$), al igual que su ganancia media diaria de peso en este periodo ($P<0,05$).

En el **capítulo V**, que contiene la publicación titulada “*Milk restricted lambs have greater colonic butyrate and a transitory modified anti-oxidant status*”, se emplearon las mismas corderas y tratamientos que en el capítulo anterior. Después del sacrificio a los

35 días de edad, se tomaron muestras del colon para determinar la concentración y las proporciones de ácidos grasos volátiles, estudiar la comunidad bacteriana epimural, analizar diversos parámetros inmunitarios locales y realizar un análisis morfométrico. La restricción de alimento durante la lactancia incrementó la proporción de ácido butírico en el colon ($P < 0,05$). También se observó una tendencia hacia una mayor expresión génica de las citoquinas antiinflamatorias TGF- β e interleuquina 4 en la mucosa del colon del grupo RES ($P < 0,1$). El resto de parámetros inmunitarios locales estudiados (TLRs, IgA secretada, linfocitos infiltrados en la lámina propia) y el grosor de las diferentes capas del colon no se vieron afectados por la ingesta restringida de lactorreemplazante ($P > 0,05$). Las corderas del grupo RES presentaron una abundancia relativa numéricamente mayor de *Butyrivibrio spp.* y menor de *Prevotella spp.* en la mucosa del colon ($P > 0,05$).

A modo de conclusión, en las condiciones del presente estudio, la restricción alimentaria durante la fase de lactancia provoca una modificación de la comunidad bacteriana epimural de íleon y colon, que es detectable en el periodo de cebo. La alimentación restringida durante la lactancia también dirige la respuesta inmunitaria del íleon hacia un perfil proinflamatorio que puede persistir en el periodo posdestete. Además, la restricción alimentaria en corderos lactantes promueve la aparición de alteraciones metabólicas relacionadas con el metabolismo lipídico y la función hepática en las fases de cebo y recría, respectivamente. Todos estos cambios causados por la restricción temprana de alimento pueden contribuir a disminuir la eficiencia alimentaria de los corderos durante el periodo de engorde, sin que se vea afectada su susceptibilidad a desarrollar acidosis ruminal.

INTRODUCCIÓN

La especie ovina desempeña un papel importante en la actividad ganadera porque, además de producir carne, leche o lana, posibilita la conservación de los ecosistemas naturales y la fijación de la población rural en las áreas desfavorecidas. Dentro de la Unión Europea, España ocupó en 2016 la segunda posición en producción de carne (117.000 toneladas) y leche de oveja (539.000 toneladas), por detrás de Reino Unido y Grecia, respectivamente (EUROSTAT, 2018a, EUROSTAT, 2018b). Según los datos del último censo realizado en 2017, se contabilizaron 15.963.106 cabezas de ganado ovino en España, correspondiendo el 57% a ovejas y corderas cubiertas para aptitud cárnica, el 15% a ovejas y corderas cubiertas para ordeño, el 4% a ovejas no cubiertas y el 24% a los corderos y sementales (S. G. Productos Ganaderos, 2018a).

Castilla y León es la segunda comunidad autónoma con mayor censo de ganado ovino, después de Extremadura, y la principal productora de leche y carne ovina a nivel nacional (S. G. Productos Ganaderos, 2018a, S. G. Productos Ganaderos, 2018b). La elevada producción láctea de Castilla y León se debe a que en esta región se concentra la mayor cabaña ovina de raza assaf, que es originaria de Israel y ha conseguido desplazar a las razas autóctonas de ordeño gracias a su elevado rendimiento lechero en sistemas de explotación intensivos (Jiménez et al., 2005, Rodríguez, 2013). La leche obtenida tras el ordeño se destina mayoritariamente a la producción quesera, mientras que los corderos son sacrificados como lechales con 9-11 kg de peso vivo. En las razas de aptitud cárnica, como la rasa y el merino precoz, los corderos son sacrificados con mayores pesos, generalmente tras un periodo de cebo en condiciones intensivas. A nivel nacional, el 14% de la carne de ovino procede de corderos lechales y el 86% restante de corderos de cebo (MAPAMA, 2017).

Coincidiendo con la reforma de la Política Agraria Comunitaria, tanto el censo ovino nacional como el de Castilla y León, en particular, han experimentado una disminución

significativa en la última década, siendo este descenso más severo en el sector cárnico que en el lácteo. De hecho, mientras que la producción española de leche de oveja se ha incrementado entre los años 2007 y 2013, la producción de carne ovina se ha reducido un 41% en este periodo de tiempo (S. G. Productos Ganaderos, 2018a, S. G. Productos Ganaderos, 2018b). El aumento en la producción láctea se ha asociado con un incremento en la demanda de quesos elaborados con leche de oveja, lo que ha favorecido la introducción de razas foráneas de alta producción como la assaf, mejoras en la alimentación y la mecanización e intensificación de los sistemas de producción, reduciéndose el número de explotaciones y aumentando el tamaño medio de los rebaños (Rodríguez, 2013). Sin embargo, en los últimos años, el escaso margen entre gastos y beneficios ha comprometido la viabilidad de muchas explotaciones familiares, de manera que la producción de leche ovina se ha reducido en un 6% desde el 2013 hasta el 2017 (S. G. Productos Ganaderos, 2018b).

Por otra parte, hay que destacar que en el declive de la producción cárnica ovina han intervenido varios factores de naturaleza económica y sociocultural que han reducido la rentabilidad de este sector. Desde el punto de vista económico, la carne de cordero tiene un elevado coste de producción en comparación con otras especies animales, como por ejemplo el porcino y las aves, que presentan un mayor índice de conversión (Gill et al., 2010). La alimentación del ganado ovino representa cerca del 60% de los costes de producción, y el aumento en el precio de los cereales y las semillas de oleaginosas durante la crisis económica ha encarecido aún más este producto (Kirschten et al., 2013), alejándolo de los consumidores. En segundo lugar, el envejecimiento de la población rural y la falta de relevo generacional ha provocado un marcado descenso en la actividad productiva. Asimismo, la despoblación de las zonas rurales y los cambios en las pautas de alimentación han disminuido el consumo de carne ovina en los hogares españoles. Los

consumidores tienen una imagen más negativa del producto a raíz de los informes que relacionan el consumo de carne roja con enfermedades cardiovasculares y cáncer (Bouvard et al., 2015), y además prefieren alimentos que requieran un menor tiempo de elaboración (Cruz, 2013).

Para reconducir esta situación es necesario aplicar estrategias alternativas en los sistemas de producción y comercialización ovina, que permitan reducir los costes de producción, el impacto medioambiental y la competencia por los recursos, así como mejorar su imagen desde el punto de vista de la salud de los consumidores y establecer nuevas formas de comercialización, más ajustadas a lo que la sociedad actual demanda. A nivel productivo es importante identificar los factores y mecanismos que regulan la eficiencia alimentaria de la especie ovina. En otras especies animales se ha descrito que la restricción de alimento en etapas tempranas de la vida, como la lactancia, puede disminuir el rendimiento productivo y la eficiencia alimentaria en el periodo posdestete (Khan et al., 2007, Soberon et al., 2012), pero existen pocos datos referentes a lo que sucede en el ganado ovino (Galvani et al., 2014). Ampliar el conocimiento en esta área permitirá mejorar la eficiencia con la que los animales utilizan el alimento en funciones productivas y reducir los costes derivados de la alimentación, potenciando la competitividad y la sostenibilidad de los sistemas de producción ovina de carne y de leche.

Referencias

- BOUVARD, V., LOOMIS, D., GUYTON, K. Z., GROSSE, Y., GHISSASSI, F. E., BENBRAHIM-TALLAA, L., GUHA, N., MATTOCK, H. & STRAIF, K. 2015. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet Oncology*, 16, 1599-1600.
- CRUZ, J. 2013. El sector ovino y caprino busca soluciones a la caída del consumo y la subida de los costes de producción. *Eurocarne: La revista internacional del sector cárnico*, 220, 31-40.

- EUROSTAT 2018a. *Milk collection (all milks) and dairy products obtained - annual data* [Online]. Available: http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=apro_mk_pobta&lang=en [Accessed 12/02/2019].
- EUROSTAT 2018b. *Production of meat: sheep and goats* [Online]. Available: <https://ec.europa.eu/eurostat/tgm/table.do?tab=table&init=1&language=en&pcode=tag00045&plugin=1> [Accessed 12/02/2019].
- 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.
- GILL, M., SMITH, P. & WILKINSON, J. M. 2010. Mitigating climate change: the role of domestic livestock. *Animal*, 4, 323-333.
- JIMÉNEZ, M. A., SERRANO NOREÑA, M. & JURADO, J. 2005. La raza Assaf española en la provincia de León. Situación actual de la raza. *Información Técnica Económica Agraria*, 101, 117-128.
- KHAN, M. A., LEE, H. J., LEE, W. S., KIM, H. S., KIM, S. B., KI, K. S., HA, J. K., LEE, H. G. & CHOI, Y. J. 2007. Pre- and postweaning performance of holstein female calves fed milk through step-down and conventional methods. *Journal of Dairy Science*, 90, 876-885.
- KIRSCHTEN, D. P., NOTTER, D. R., LEEDS, T. D., MOUSEL, M. R., TAYLOR, J. B. & LEWIS, G. S. 2013. Evaluation of Columbia, USMARC-Composite, Suffolk, and Texel rams as terminal sires in an extensive rangeland production system: V. Postweaning growth, feed intake, and feed efficiency. *Journal of Animal Science*, 91, 2021-2033.
- MAPAMA 2017. Encuesta de sacrificio de ganado 2017. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- RODRÍGUEZ, L. A. 2013. *Análisis de la rentabilidad en las explotaciones de ovino de leche en Castilla y León*. Tesis doctoral, Departamento de Producción Animal, Universidad de León.
- S. G. PRODUCTOS GANADEROS 2018a. El sector ovino y caprino de carne en cifras: principales indicadores económicos. Madrid, España: Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- S. G. PRODUCTOS GANADEROS 2018b. El sector ovino y caprino de leche en cifras: principales indicadores económicos. Madrid, España: Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- 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.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de investigación ha sido estudiar el efecto de la restricción alimentaria de corderos en la fase de lactancia con el fin de identificar algunas de las causas subyacentes a una baja eficiencia alimentaria (alteraciones en el sistema inmunitario, la microbiota epimural y el metabolismo) durante las etapas de cebo y recría.

La memoria se presenta con el modelo de compendio de artículos y está compuesta por 5 capítulos, que se corresponden con 5 publicaciones científicas en las que se han abordado los siguientes objetivos parciales:

1- Determinar si la alimentación restringida en corderos lactantes puede promover cambios en la microbiota epimural y en parámetros inmunitarios del íleon tras el destete, en el periodo de cebo.

2- Estudiar si la restricción de alimento en corderos durante la fase de lactancia puede influir sobre la microbiota epimural del rumen y la aparición de acidosis ruminal y otras alteraciones metabólicas tras el destete, en el periodo de cebo.

3- Determinar si la alimentación restringida en corderos lactantes puede inducir cambios en la microbiota epimural y en parámetros inmunitarios del colon tras el destete, en el periodo de cebo.

4- Estudiar si la ingestión restringida de lactorreemplazante en corderas puede modificar parámetros inmunitarios del íleon durante la lactancia y programar efectos a largo plazo sobre el perfil bioquímico en la fase de recría.

5- Determinar si la ingestión de cantidades restringidas de lactorreemplazante en corderas puede promover cambios en la microbiota epimural y en parámetros inmunitarios del colon durante la fase de lactancia.

Para abordar estos objetivos se llevaron a cabo dos pruebas experimentales, orientadas a evaluar la respuesta de la restricción en la lactancia a corto plazo, en corderos de cebo, y a medio plazo, en corderas de recría. En la primera prueba (Experimento I) la fase posdestete comprendió el periodo de cebo, que se extendió desde el destete hasta los 27 kg de peso, aproximadamente a los 4 meses de edad. En la segunda prueba (Experimento II), la fase posdestete se prolongó desde el destete hasta los 9 meses de edad.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Eficiencia alimentaria

1.1. Definición y concepto

En un contexto productivo, la eficiencia alimentaria evalúa la capacidad que tienen los animales de convertir el alimento que consumen en un aumento de peso o en la producción de leche.

1.2. Medidas de eficiencia alimentaria

La eficiencia alimentaria puede estimarse a través de diferentes formas, entre las que destacan el índice de conversión, la ganancia residual de peso y el consumo residual de alimento.

El índice de conversión representa la cantidad de alimento necesaria para producir una unidad de producto animal. Este índice, que se ha utilizado con bastante frecuencia para medir la eficiencia alimentaria en razas de aptitud cárnica, se calcula como el cociente entre la ingesta media diaria de materia seca y la ganancia media diaria de peso (ADG). Sin embargo, su aplicación como herramienta de selección genética no es adecuada porque está correlacionado con la ADG (Snowder and Van Vleck, 2003) y un menor índice de conversión no implica que el animal utilice de forma más eficiente los nutrientes para el crecimiento, sino que, cuanto mayor es el nivel de ingestión y la ADG, menos porcentaje representan los gastos de mantenimiento. Además, el índice de conversión no tiene en cuenta el peso de los animales y, por tanto, no es adecuado para comparar animales de distinto peso. Como formas alternativas para medir la eficiencia alimentaria, Koch et al. (1963) propusieron la ganancia residual de peso y el consumo residual de alimento.

La ganancia residual de peso (RG) es una medida de la ganancia de peso ajustada para el consumo de alimento y el peso vivo (Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). De acuerdo con esta definición, los animales más eficientes son aquellos que poseen un mayor valor RG, porque adquieren más peso que otros consumiendo la misma cantidad de alimento. La RG presenta el inconveniente de que, al igual que sucedía con el índice de conversión, está correlacionada con la ADG. Por esta razón, ha cobrado más interés en la actualidad el estudio del consumo residual de alimento, que es independiente del ritmo de crecimiento y del peso vivo (Cantalapiedra-Hijar et al., 2018).

El consumo residual de alimento (RFI) se define como la diferencia entre el consumo observado y el consumo estimado para un animal, en base a sus necesidades de mantenimiento (que son función del peso vivo) y de crecimiento (que son función de la ADG) durante un periodo determinado de tiempo (Trujillo, 2015). Para calcularlo se utiliza un modelo estadístico de regresión lineal múltiple:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 MMW_i + \beta_2 ADG_i + e_i$$

donde Y_i representa el consumo previsto del animal, β_0 es la ordenada en el origen de la ecuación, β_1 es el coeficiente de regresión del peso metabólico medio (MMW), β_2 es el coeficiente de regresión de la ADG y e_i es el error residual. El RFI se obtiene a partir de la diferencia entre el consumo observado y el consumo estimado con el modelo estadístico, de modo que los animales con menor valor RFI son considerados más eficientes porque ingieren menos alimento que el que podría esperarse en régimen *ad libitum* para un ritmo de crecimiento determinado. En ganado ovino se ha comprobado que los corderos con menor valor RFI (y, por tanto, más eficientes) consumen entre un 11 y un 18% menos de materia seca en el periodo de cebo y tienen una ADG similar a los de mayor RFI (Sharifabadi et al., 2012, de Paula et al., 2013, Liang et al., 2017, Zhang et

al., 2017). Teniendo en cuenta que el cebo de corderos ligeros tiene una duración aproximada de 50 días, reducir en 150 g el consumo medio diario de cada cordero manteniendo la misma ADG permitiría ahorrar 7,5 kg de alimento en todo el periodo, disminuyendo significativamente los costes de producción derivados de la alimentación. Además, contribuiría a reducir el impacto medioambiental de la actividad ganadera, ya que los rumiantes más eficientes producen menos metano (Hegarty et al., 2007, Basarab et al., 2013).

No obstante, el principal problema a la hora de aplicar el RFI como método de selección en las explotaciones ganaderas es que su determinación es costosa, ya que exige controlar la ingesta individual de los animales durante prolongados periodos de tiempo. Una alternativa más rápida y rentable para la selección de animales en función del RFI puede ser la identificación de marcadores biológicos que estén relacionados con la eficiencia alimentaria (Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). Algunos de estos marcadores se describen en los apartados que aparecen a continuación en esta memoria.

1.3. Factores que afectan a la eficiencia alimentaria

A día de hoy se sabe que en la variación individual del RFI intervienen distintos factores como la digestión, el metabolismo, la composición corporal, la actividad física y la termorregulación (Herd and Arthur, 2009). A su vez ha de tenerse en cuenta que estos aspectos se ven influidos por el estado fisiológico, el manejo y la alimentación (Kenny et al., 2018).

Los animales más eficientes (menor RFI) pueden tener unas necesidades energéticas de mantenimiento más bajas que los menos eficientes (Herd and Bishop, 2000), debido a cambios en el tamaño de sus órganos (Herd and Arthur, 2009) y a diferencias en procesos fisiológicos como el *turnover* proteico, la absorción de nutrientes, la producción de ATP

a nivel mitocondrial o la respuesta frente al estrés (Cantalapiedra-Hijar et al., 2018, Kenny et al., 2018). Se ha descrito que los corderos de cebo con menor RFI poseen un rumen más pequeño y un duodeno y un íleon más largo (Zhang et al., 2017), lo que puede estar ligado a un menor nivel de ingestión, a una menor producción de metano (Goopy et al., 2014) y a una mayor capacidad de absorción intestinal (Fitzsimons et al., 2017). Asimismo, el menor tamaño de hígado, pulmones y riñones de los corderos más eficientes puede reducir su metabolismo basal, favoreciendo un mejor aprovechamiento de los nutrientes que se destinan a funciones productivas (Zhang et al., 2017). Las mitocondrias son responsables de producir el 90% de la energía celular, de manera que variaciones en su actividad pueden asociarse con diferencias en la eficiencia (Herd and Arthur, 2009). De hecho, se ha observado que los corderos más eficientes (menor RFI) presentan una mayor actividad de la cadena de transporte de electrones localizada en las mitocondrias del músculo (Sharifabadi et al., 2012).

La respuesta de los animales frente al estrés también puede condicionar la eficiencia alimentaria debido a que la activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) incrementa el metabolismo y consecuentemente eleva el consumo de energía. En este sentido, se ha comprobado que los ovinos menos eficientes (mayor RFI) pueden ser más susceptibles al estrés porque presentan una concentración más elevada de la hormona adrenocorticotropa (ACTH; (Zhang et al., 2017)) y, tras la estimulación con ACTH o insulina exógena, un incremento mayor de la concentración de cortisol en sangre en comparación con los más eficientes (Knott et al., 2008, Knott et al., 2010). Las alteraciones observadas en algunos parámetros hematológicos de los ovinos menos eficientes, como el aumento en el recuento de glóbulos rojos (Rincón- Delgado et al., 2011) y la disminución en el porcentaje de eosinófilos (De Paula Vieira et al., 2012) también son típicos indicadores de estrés.

Los cambios en la composición corporal pueden afectar a la eficiencia alimentaria porque el aumento de peso basado en la deposición de proteína es más eficiente que el obtenido a partir del depósito de grasa. Se ha descrito que los corderos y terneros con menor RFI presentan mayores concentraciones sanguíneas de creatinina (Richardson et al., 2004, Lawrence et al., 2012, de Paula et al., 2013, Fitzsimons et al., 2013), un producto final de la degradación de la creatina que sirve como indicador de la masa muscular (Caldeira et al., 2007). La creatinina está correlacionada negativamente con el grosor de la grasa del lomo ovino (Clarke et al., 1996), por lo que el menor depósito de tejido adiposo observado en el lomo de los corderos más eficientes (Zhang et al., 2017) se encuentra en consonancia con las mayores concentraciones sanguíneas de este metabolito. En cambio, hormonas con roles importantes en el metabolismo y la composición corporal, como la leptina, la insulina o el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), no parecen estar asociadas con el RFI en la especie ovina (Zhang et al., 2017), al igual que se ha observado en terneros (Lawrence et al., 2012). Parámetros bioquímicos como la glucosa, los triglicéridos o la proteína total tampoco han demostrado ser predictores fiables del RFI, o al menos no se han obtenido resultados consistentes entre los estudios publicados hasta el momento (Rincón- Delgado et al., 2011, de Paula et al., 2013).

Dado que el rumen desempeña un papel muy importante en la digestión del alimento y en la obtención de energía, la fermentación microbiana a este nivel puede influir sobre la eficiencia alimentaria. Se ha observado que los corderos más eficientes (menor RFI) tienen concentraciones superiores de ácido propiónico en el líquido ruminal que los menos eficientes (Ellison et al., 2017, Liang et al., 2017). El aumento en la proporción de propiónico puede contribuir a mejorar la eficiencia porque la producción de este ácido no se asocia con la formación de metano (Van Soest, 1994), un proceso en el que los

rumiantes pueden perder entre un 5,5 y un 10% de la energía obtenida con el alimento (Nicholson et al., 2007). También se han encontrado diferencias en la composición de la microbiota del contenido ruminal entre los ovinos con distinto RFI y parece que géneros bacterianos como *Prevotella*, *Ruminococcus* y *Butyrivibrio* podrían estar implicados (Ellison et al., 2017, Liang et al., 2017, Perea et al., 2017). De todos ellos, *Prevotella* destaca por ser el género bacteriano más abundante en el rumen y haberse asociado con una baja eficiencia alimentaria en diversos estudios realizados en ganado vacuno (Carberry et al., 2012, McCann et al., 2014, Myer et al., 2015a). Algunos autores han sugerido que la mayor abundancia de *Prevotella spp.* en el rumen de los animales menos eficientes es independiente de la ración empleada y que puede deberse a causas genéticas (Carberry et al., 2012). La microbiota presente en tramos posteriores del tracto gastrointestinal, como el intestino delgado y el colon, también se ha vinculado con diferencias en la eficiencia alimentaria ovina, porque los microorganismos pueden competir por los nutrientes que se absorben en el intestino delgado (Perea et al., 2017) y fermentar carbohidratos en el colon para la obtención de energía (Myer et al., 2015b).

Por otra parte, los trastornos metabólicos como la acidosis ruminal reducen la ingestión de alimento y la digestibilidad de la fibra, disminuyendo la disponibilidad de nutrientes para la expresión de funciones productivas tan importantes como el crecimiento o la reproducción (Rauw, 2012). De manera análoga, cuando los animales enferman y el sistema inmunitario se activa para combatir la infección, se reduce el rendimiento productivo. Por tanto, seleccionar animales que sean más robustos (sanos) y resilientes a estos procesos permitiría mejorar la eficiencia alimentaria (Animal Task Force, 2013). En este contexto, la resiliencia se define como la capacidad de los animales para expresar un elevado potencial productivo en una amplia variedad de condiciones ambientales (Knap, 2005). Los animales resilientes disponen de un sistema inmunitario capaz de mantener un

equilibrio óptimo entre la inmunotolerancia (falta de respuesta) frente a los antígenos propios y la respuesta frente a los patógenos. Gracias a ello, estos animales enferman menos y pueden emplear los nutrientes de un modo más eficiente en finalidades productivas (Friggens et al., 2017).

2. Respuesta inmunitaria

2.1. Definición y concepto

La respuesta inmunitaria puede definirse como el mecanismo de defensa que desencadena el organismo ante la presencia de bacterias, virus y sustancias que no reconoce (Riera, 2008). Su funcionamiento es esencial para la vida y requiere una estrecha cooperación entre sus dos principales ramas: la respuesta inmunitaria innata y la respuesta inmunitaria adquirida. La respuesta inmunitaria innata constituye la primera línea de defensa del organismo, se ocupa de eliminar a los patógenos invasores o de controlarlos hasta que pueda elaborarse una respuesta inmunitaria adquirida, mucho más específica que la primera (Kelly and Coutts, 2000).

2.2. Respuesta inmunitaria innata

La respuesta inmunitaria innata es un mecanismo de defensa muy conservado evolutivamente para combatir la enfermedad a través del reconocimiento de antígenos y la elaboración de una reacción rápida e inespecífica contra ellos. Está compuesta por barreras físicas como la piel y las secreciones mucosas (Hughes, 1999, Nova et al., 2004), células con función fagocítica (macrófagos, neutrófilos, monocitos, células dendríticas), células *natural killer*, el sistema de complemento y las citoquinas (Kelly and Coutts, 2000, Riera, 2008). Las células fagocíticas atacan a los patógenos en los lugares de infección antes de que tengan oportunidad de proliferar, mientras que las células *natural killer* actúan contra las células que ya han sido infectadas por patógenos. Las proteínas

del sistema de complemento tienen un papel importante en la defensa contra las infecciones, uniéndose por enlace covalente a la superficie de los microorganismos para destruirlos (Tizard, 2013). Las citoquinas son una clase de proteínas producidas por las células inmunitarias, capaces de regular la respuesta inmunitaria a nivel local y sistémico ejerciendo distintas funciones sobre las células.

El sistema inmunitario innato se activa en el momento del parto, cuando los microorganismos colonizan por primera vez las mucosas del tracto gastrointestinal (Roux et al., 2008). En ese momento, los receptores de reconocimiento de patrones localizados en las células inmunitarias identifican unas señales de alarma llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que están presentes en muchos microorganismos. Entre las distintas clases de receptores destacan los receptores de tipo Toll (TLRs), que son unas glicoproteínas transmembrana que se expresan en macrófagos, mastocitos, células dendríticas y células epiteliales del tracto respiratorio y digestivo (Tizard, 2013). En rumiantes se han descrito 10 tipos de TLRs, clasificándose en función de si se localizan en la superficie celular para identificar proteínas bacterianas, lipoproteínas y lipopolisacáridos (TLRs 1, 2, 4-6, 10) o a nivel intracelular para reconocer ácidos nucleicos víricos o bacterianos (TLRs 3, 7-9) (Malmuthuge et al., 2012). Tras la unión de los PAMPs a los TLRs, las células inmunitarias secretan diversos tipos de citoquinas. Si el antígeno no representa una seria amenaza para el organismo, se liberan citoquinas antiinflamatorias como la interleuquina 4 (IL-4), la IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). En caso de infección, se producen citoquinas proinflamatorias como el interferón gamma (IFN- γ), la IL-2, la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y se inicia una respuesta inflamatoria aguda (Petersen et al., 2004).

Tabla 1: Origen y funciones de algunas citoquinas. Extraído de Tizard (2013).

Nombre	Abreviación	Células productoras	Funciones [(+): estimula, (-): inhibe]
Interferón gamma	IFN- γ	Linfocitos Th1, linfocitos T CD8 ⁺ y células <i>natural killer</i>	(+) Macrófagos y células <i>natural killer</i> (+) Linfocitos Th1 (-) Linfocitos Th2
Interleuquina 2	IL-2	Linfocitos Th1 y células <i>natural killer</i>	(+) IFN- γ (+) Linfocitos T y linfocitos B (+) Macrófagos y células <i>natural killer</i>
Interleuquina 4	IL-4	Linfocitos Th2, mastocitos	(+) Linfocitos B (-) IFN- γ , IL-6 (-) Linfocitos Th17
Interleuquina 6	IL-6	Macrófagos, linfocitos B, linfocitos T, mastocitos	(+) Linfocitos B y linfocitos Th17 (+) Proteínas de fase aguda positivas
Interleuquina 10	IL-10	Linfocitos T, macrófagos, células dendríticas	(+) Linfocitos T reguladores (-) Macrófagos, células dendríticas, células <i>natural killer</i> (-) Citoquinas Th1, Th2 y Th17
Interleuquina 17 A	IL-17 A	Linfocitos Th17	(+) Macrófagos (+) IL-1, IL-6

			(+) proteínas de fase aguda positivas
Factor de crecimiento transformante beta	TGF- β	Plaquetas, macrófagos, neutrófilos, linfocitos B y linfocitos T	(+) Producción inmunoglobulina A (+) Linfocitos Th17 (-) IFN- γ (-) Linfocitos B y linfocitos T

El aumento de las concentraciones de las citoquinas proinflamatorias a nivel sistémico desencadena una serie de reacciones características, incluyendo fiebre, cambios en la síntesis hepática de las proteínas de fase aguda, aumento del número de leucocitos sanguíneos, letargia y anorexia (Carroll and Forsberg, 2007). La fiebre actúa como un mecanismo de defensa para eliminar eficazmente muchas bacterias y acelerar la proliferación de las células inmunitarias. En circunstancias normales el hígado sintetiza proteínas de fase aguda negativas (APP-), entre las que destacan la albúmina, la proteína transportadora de retinol, las lipoproteínas de alta y de baja densidad y la enzima paraoxonasa (Trevisi et al., 2016), que cumplen distintas funciones biológicas. La albúmina favorece la presión osmótica coloidal del plasma e interviene en el transporte de diversas moléculas, como los ácidos grasos no esterificados y la bilirrubina no conjugada (Tóthová et al., 2014), la proteína transportadora de retinol forma un complejo con el retinol (vitamina A) para conducir a esta vitamina a la circulación sanguínea, las lipoproteínas transportan a los lípidos insolubles en el plasma y la paraoxonasa protege a las lipoproteínas de la oxidación (Bertoni and Trevisi, 2013). Durante la respuesta inflamatoria aguda, las citoquinas proinflamatorias inducen una disminución en la producción hepática de las APP- y estimulan la síntesis de las proteínas de fase aguda positivas (APP+), como la haptoglobina, la ceruloplasmina, el amiloide A sérico, la proteína C reactiva y el fibrinógeno. Como consecuencia de ello, se reducen las concentraciones plasmáticas de las APP- y aumentan los niveles circulantes de las APP+ (Petersen et al., 2004, Bertoni and Trevisi, 2013), que colaboran en la respuesta inmunitaria y en la reparación de los tejidos dañados (Carroll and Forsberg, 2007).

Algunos indicadores de inmunidad innata a nivel sistémico en rumiantes son el número de neutrófilos y monocitos presentes en la sangre y las concentraciones plasmáticas de las proteínas del sistema de complemento y de las citoquinas (He et al., 2014, Wooldridge

et al., 2014). Además, las concentraciones sanguíneas de parámetros relacionados con la inflamación (APP+ y APP-) y el estrés oxidativo (oxidantes como el peróxido de hidrógeno y antioxidantes como la superóxido dismutasa, la paraoxonasa o la albúmina) pueden proporcionar información valiosa sobre el sistema inmunitario innato (Trevisi et al., 2016) porque parte de sus mecanismos de defensa se basan precisamente en la inflamación y en la producción de moléculas oxidantes (Chew and Park, 2004).

2.3. Respuesta inmunitaria adquirida

La respuesta inmunitaria adquirida se caracteriza por ser más lenta que la innata, dirigirse específicamente contra cada antígeno y poseer memoria, lo que permite eliminar de manera más rápida y eficaz reinfecciones por el mismo patógeno (Riera, 2008). En este tipo de respuesta participan los linfocitos, que se dividen en dos grandes poblaciones:

- Linfocitos B: son los responsables de la respuesta inmunitaria humoral o mediada por anticuerpos. Se originan en la médula ósea, pero maduran en las placas de Peyer (PP) del íleon de los rumiantes (Yasuda et al., 2006). En otras especies animales como el porcino, los conejos o las aves, las PP del íleon no son necesarias para el desarrollo de los linfocitos B (Sinkora et al., 2011).
- Linfocitos T: se encargan de la respuesta inmunitaria celular. Se desarrollan en el timo y después migran a órganos linfoides secundarios para activarse en presencia de antígenos presentados por las células presentadoras de antígeno (macrófagos, linfocitos B y células dendríticas). Se distinguen principalmente dos tipos de linfocitos T:
 - CD8⁺ o citotóxicos: expresan la molécula CD8 en su superficie y sus receptores reconocen antígenos que se presentan unidos a proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (Nova et al., 2004). Su

función se basa en destruir mediante apoptosis células que hayan sido infectadas por un patógeno intracelular.

- CD4⁺ o colaboradores: reciben esta denominación porque expresan la molécula CD4 en su superficie y producen citoquinas que ayudan a otros linfocitos a desarrollarse y dividirse. Reconocen aquellos antígenos que se presentan unidos a proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (Riera, 2008). Los linfocitos CD4⁺ se clasifican a su vez en varias subpoblaciones según el patrón de citoquinas que secretan:
 - Linfocitos Th1: producen citoquinas proinflamatorias (IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-12, TNF- α) y promueven el desarrollo de inmunidad celular contra antígenos intracelulares (Hughes, 1999).
 - Linfocitos Th2: secretan citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13), que estimulan la activación y diferenciación de los linfocitos B, para elaborar una respuesta inmunitaria humoral frente a antígenos extracelulares (Roux et al., 2008). Como las citoquinas de los patrones Th1 y Th2 ejercen funciones opuestas, cada grupo de citoquinas puede inhibir la liberación de las citoquinas contrarias y dirigir al sistema inmunitario hacia la respuesta celular o humoral.
 - Linfocitos Th17: producen las citoquinas IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-26, que estimulan la acumulación de neutrófilos en los lugares de infección y la secreción de péptidos antimicrobianos para prevenir la propagación de los patógenos (Blaschitz and Raffatellu, 2010).

Aunque en humanos y ratones la mayoría de linfocitos T circulantes, incluidos los CD4⁺ y CD8⁺, contienen receptores antigénicos alfa/beta, se estima que los rumiantes pueden poseer entre un 15 y un 60% de linfocitos con receptores gamma/delta en la sangre

(Davis et al., 1996). Estos linfocitos, denominados gamma/delta, son capaces de secretar la citoquina antiinflamatoria IL-10 y se cree que cumplen un papel muy importante en la regulación del sistema inmunitario del ganado bovino (Guzman et al., 2014). De hecho, los linfocitos T gamma/delta pueden controlar la inflamación a nivel de la mucosa intestinal (Márquez et al., 2000).

2.4. Respuesta inmunitaria a nivel de las mucosas

Una parte fundamental del sistema inmunitario se localiza de manera estratégica en las mucosas del tracto gastrointestinal, constituyendo el tejido linfoide asociado al intestino (GALT). Anatómica y funcionalmente, el GALT se divide en dos compartimentos distintos (Bargalló, 2016):

- GALT organizado: compuesto por folículos linfoides aislados, folículos linfoides asociados o placas de Peyer y ganglios linfáticos. Se considera que el GALT organizado es inductor de la respuesta inmunitaria intestinal porque en estas zonas tienen lugar el procesamiento y la presentación antigénica a los linfocitos T y linfocitos B (Olsen, 2015).
- GALT difuso: integrado por poblaciones de linfocitos que se localizan en el epitelio (intraepiteliales) y en la lámina propia. Desempeña un papel efector, ya que desarrolla una respuesta inmunitaria local para prevenir la entrada y la diseminación de patógenos.

El epitelio que recubre a los folículos linfoides delimita la separación entre el contenido luminal y el tejido intersticial, por lo que además de controlar la entrada de potenciales patógenos, participa en la absorción de los nutrientes de la dieta. Este epitelio asociado al folículo se caracteriza por poseer células M (*microfold cells*), que están especializadas en capturar antígenos luminales y transportarlos para presentarlos a los

linfocitos (Mowat and Agace, 2014, Olsen, 2015). Además de las células M, los enterocitos y las células dendríticas pueden intervenir en el proceso de captación de antígenos (Kaiserlian and Etchart, 1999). El desarrollo de esta actividad es fundamental para que pueda iniciarse una respuesta inmunitaria en las PP contra algunos antígenos (Mabbott et al., 2013). En la especie ovina, las PP se distribuyen de manera continua en el íleon y dispersamente a lo largo del yeyuno. Las PP del íleon son las responsables de la maduración de los linfocitos B (Yasuda et al., 2006) e involucionan gradualmente con la edad (Reynolds and Morris, 1983, Lie et al., 2005), lo que indica que su función principal se limita a etapas tempranas del desarrollo del sistema inmunitario. En cambio, las PP del yeyuno persisten durante toda la vida y pueden cumplir un rol secundario en la respuesta inmunitaria a nivel local (Yasuda et al., 2006). Los linfocitos B se activan en los centros germinales de las PP en presencia de antígenos y, después de acceder a la circulación, regresan a la lámina propia del intestino, diferenciándose en células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas (Nayak et al., 2009). Entre todas las clases de inmunoglobulinas (Ig), la IgA es la más abundante en las mucosas (Gleeson and Cripps, 2004) y ejerce una función esencial en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, al impedir la entrada de patógenos y controlar la microbiota comensal del lumen (Cerutti and Rescigno, 2008). La IgA también puede transportar antígenos de la lámina propia hacia la superficie apical del enterocito (Robinson et al., 2001) y neutralizar productos microbianos con actividad proinflamatoria como el lipopolisacárido (Cerutti and Rescigno, 2008), que se encuentra en la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

2.5. Factores que influyen en la respuesta inmunitaria

Entre los diversos factores que pueden afectar al desarrollo de la respuesta inmunitaria, destacan la colonización bacteriana de las mucosas, la exposición a situaciones de estrés y la alimentación durante fases tempranas de la vida como la gestación y la lactancia.

2.5.1. Microbiota comensal

Adherida al epitelio del tracto gastrointestinal se encuentra una compleja comunidad bacteriana, denominada microbiota epimural, que se establece en los corderos desde los primeros días de vida (Mueller et al., 1984). Las bacterias que colonizan las mucosas están en íntimo contacto con el hospedador e interaccionan con él, de modo que participan activamente en la respuesta del sistema inmunitario (Chowdhury et al., 2007). De hecho, la microbiota epimural es capaz de modular la inmunidad innata modificando la expresión génica de los TLRs (Wang et al., 2010b) y dirigir la respuesta inmunitaria hacia la inflamación, mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias, o la inmunotolerancia, liberando citoquinas antiinflamatorias (Abreu, 2010). Además, la comunidad bacteriana epimural varía a lo largo del tracto gastrointestinal, de manera que puede inducir diferencias regionales en la expresión de los TLRs (Wang et al., 2010b, Malmuthuge et al., 2012). Para el mantenimiento de la homeostasis resulta esencial que los TLRs reconozcan a las bacterias comensales, evitando una excesiva respuesta inflamatoria del sistema inmunitario (Malmuthuge et al., 2012). Asimismo, las bacterias comensales pueden influir en el desarrollo de la inmunidad adquirida y regular la producción de IgA en las mucosas. Las propiedades moduladoras de las bacterias sobre la respuesta inmunitaria posibilitan su utilización como probióticos, es decir, como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador (Guarner and Schaafsma, 1998). Entre los

géneros más utilizados como probióticos destacan *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*, que al adherirse a la mucosa intestinal pueden facilitar la exclusión de microorganismos patógenos y favorecer el desarrollo de una microbiota saludable (Uyeno et al., 2015).

2.5.2. Estrés agudo y estrés crónico

El estrés se define como un conjunto de reacciones biológicas a un estímulo que altera la homeostasis del organismo (Pacak and Palkovits, 2001). En producción animal las principales causas de estrés en rumiantes son el ambiente (por ejemplo, la temperatura y el ruido), las prácticas de manejo (la mezcla de animales en lotes, el destete, la castración, el transporte, etc.), las enfermedades y la escasez de alimento.

Una situación de estrés agudo induce una serie de respuestas fisiológicas en el organismo mediante la activación del eje HPA para intentar reestablecer la homeostasis (Dhabhar, 2014). En primer lugar, las neuronas del hipotálamo secretan la hormona liberadora de corticotropina y la vasopresina. Estas hormonas estimulan a las células corticotropas del lóbulo anterior de la pituitaria (adenohipófisis) para que secreten la ACTH. La ACTH favorece a su vez la síntesis y liberación de glucocorticoides desde las glándulas adrenales, una clase de hormonas esteroideas esenciales para la supervivencia (Carroll and Forsberg, 2007). Los glucocorticoides, además de intervenir en la respuesta frente al estrés, preparando al sistema inmunitario contra potenciales patógenos invasores, ejercen funciones supresoras sobre la inflamación y la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, se sabe que los glucocorticoides inhiben la liberación de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 e IL-12, previniendo la aparición de una respuesta inflamatoria a nivel sistémico (Schleimer, 2004). Sin embargo, la exposición prolongada a elevadas concentraciones de glucocorticoides puede comprometer al sistema inmunitario, ya que las células inmunitarias pueden desarrollar tolerancia a estas hormonas y perder

capacidad de respuesta (Carroll and Forsberg, 2007). El estrés crónico también puede incrementar la apoptosis de las células del timo y causar la atrofia del órgano (Biolatti et al., 2005), así como suprimir la producción de anticuerpos y la actividad de las células *natural killer* (Dhabhar, 2014).

2.5.3. Estrés oxidativo

Si se reduce la ingestión de nutrientes con propiedades antioxidantes (vitamina E, vitamina C, selenio, etc.), puede aparecer estrés oxidativo (Tatli et al., 2000), especialmente en circunstancias que requieran un mayor aporte de estas sustancias, como las situaciones de estrés. El estrés oxidativo perjudica el rendimiento productivo de los animales porque ejerce un efecto inmunodepresor que predispone al desarrollo de diversas enfermedades, como, por ejemplo, mastitis, problemas reproductivos, retención placentaria, cetosis, acidosis e hígado graso (Celi, 2011, Morán et al., 2012).

Entre las moléculas prooxidantes presentes en los sistemas biológicos, las más abundantes son las especies reactivas de oxígeno (ROS). En bajas concentraciones, las ROS intervienen en varios procesos fisiológicos como la respuesta inmunitaria o la detoxificación de xenobióticos (Urquiaga and Leighton, 2000), pero cuando se producen en exceso ocasionan daños a nivel celular en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Sugino, 2006).

Las células inmunitarias son particularmente susceptibles al estrés oxidativo porque en su actividad fagocítica contra los microorganismos patógenos liberan grandes cantidades de ROS (Hughes, 1999, Chew and Park, 2004) y óxido nítrico, que puede interactuar con otros compuestos generando nuevas especies reactivas de nitrógeno (Predonzani et al., 2015). Además, la membrana plasmática de las células inmunitarias contiene un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (Meydani et al., 1995), los

cuales son una de las dianas preferidas de las ROS. Por este motivo, los productos de la peroxidación lipídica, como el malondialdehído (MDA), son considerados buenos indicadores de estrés oxidativo (Celi, 2011).

Para neutralizar las ROS el organismo cuenta con un sistema de defensa integrado por varios componentes:

- De origen enzimático: lo constituyen la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa, la mieloperoxidasa y la paraoxonasa.
 - La SOD es la primera defensa intracelular contra las ROS y promueve la conversión del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Debido a que el H_2O_2 también presenta poder oxidante, debe ser catabolizado mediante la acción de la GPx, la catalasa o la mieloperoxidasa (Dröge, 2002, Chew and Park, 2004).
 - La paraoxonasa retrasa la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Ece et al., 2007) y confiere actividad antioxidante a las lipoproteínas de alta densidad (Mackness et al., 2001).
- De origen no enzimático: incluyen a la albúmina, la bilirrubina, el glutatión, el α -tocoferol y el ácido ascórbico, entre otros.
 - La albúmina se sintetiza exclusivamente en el hígado y ejerce sus funciones antioxidantes en plasma gracias a sus reactivos grupos sulfhidrilo (-SH) que tienen fuertes propiedades reductoras (Moran et al., 2001).
 - La bilirrubina participa en un importante ciclo antioxidante ya que se oxida con H_2O_2 convirtiéndose en biliverdina, y ésta se transforma de nuevo en bilirrubina a través de la biliverdina reductasa (Jansen and Daiber, 2012).

- El glutatión protege a las células del estrés oxidativo actuando como sustrato o cofactor en reacciones enzimáticas que permiten neutralizar las ROS (Birben et al., 2012).
- El α -tocoferol es la forma más activa de la vitamina E y se acumula mayoritariamente en las membranas de las células inmunitarias para protegerlas de las ROS (Carroll and Forsberg, 2007).
- El ácido ascórbico (vitamina C) actúa a nivel intracelular y extracelular neutralizando las ROS (Birben et al., 2012).

Dada la dificultad que existe para medir por separado los antioxidantes plasmáticos y sus interacciones, se han desarrollado diferentes métodos que permiten evaluar la capacidad antioxidante total. Entre los parámetros de capacidad antioxidante destaca el potencial reductor férrico (FRAP), que integra a numerosos antioxidantes plasmáticos como el ácido ascórbico, el α -tocoferol, el ácido úrico, varias proteínas y la bilirrubina (Benzie and Strain, 1996) y proporciona información valiosa sobre el estatus oxidativo a este nivel.

2.5. 4. Restricción alimentaria en la gestación

Una nutrición materna insuficiente durante la gestación puede influir negativamente en el desarrollo del sistema inmunitario fetal a través de 2 mecanismos distintos:

- Activación del eje HPA materno: ante una situación de estrés como la alimentación restringida, los glucocorticoides maternos pueden activar prematuramente el sensible eje HPA del feto, perjudicando a su sistema inmunitario (Palmer, 2011).
- Limitación de los nutrientes disponibles para el feto: como mecanismo de adaptación para preservar la viabilidad del feto, los nutrientes se dirigen

preferentemente hacia el corazón y el sistema nervioso del feto, en detrimento de otros órganos y tejidos como los del sistema inmunitario. La restricción alimentaria materna puede comprometer de forma más severa al sistema inmunitario del feto cuando tiene lugar en la última parte de gestación, debido a que en esta etapa se produce el mayor crecimiento fetal y la demanda de nutrientes es mayor (Nielsen et al., 2013). En cabras se ha comprobado que tanto la restricción energética como la restricción proteica en los dos últimos meses de gestación afecta negativamente al sistema inmunitario de los cabritos recién nacidos disminuyendo las concentraciones plasmáticas de las proteínas del sistema de complemento y de IgG, así como la expresión de varias citoquinas en el yeyuno (He et al., 2014). Asimismo, los órganos linfoides timo y bazo en corderos recién nacidos con crecimiento intrauterino restringido son más pequeños (Greenwood et al., 2004), lo que se ha asociado con un reducido número de linfocitos T en la sangre y en el timo (Gao et al., 2012, Gao et al., 2013, Liu et al., 2015b).

2.5.5. Restricción alimentaria en la lactancia

La placenta epiteliochorial de los rumiantes no permite la adecuada transferencia de anticuerpos maternos al feto durante la gestación. Por este motivo, los corderos nacen con un sistema inmunitario inmaduro y necesitan ingerir el calostro durante las primeras 48 horas de vida, cuando el epitelio intestinal todavía es permeable a macromoléculas intactas, para adquirir una inmunidad pasiva (Stelwagen et al., 2009). El calostro y la leche de los rumiantes contienen, además de IgG –y en reducidas concentraciones, IgA e IgM-, hormonas, factores de crecimiento, células inmunitarias, oligosacáridos, ROS, proteínas de fase aguda, citoquinas antiinflamatorias (TGF- β , IL-10), péptidos y proteínas con actividad antimicrobiana (Rainard and Riollot, 2006). Los compuestos bioactivos

presentes en el calostro y en la leche también estimulan la proliferación de la mucosa intestinal y facilitan el cierre de la membrana intestinal para limitar la exposición antigénica (Gleeson and Cripps, 2004, Takeda et al., 2004). Debido al papel crucial que desempeña el calostro en la maduración del sistema inmunitario y en el desarrollo del tracto gastrointestinal, los corderos que no se alimentan debidamente con calostro presentan una mayor susceptibilidad a padecer enfermedades e índices de mortalidad más elevados (Hernández-Castellano et al., 2015b).

Los anticuerpos maternos que reciben pasivamente las crías con la ingesta de calostro ejercen un efecto supresor sobre el desarrollo del sistema inmunitario localizado en las mucosas de los recién nacidos (Gleeson and Cripps, 2004). El tiempo que los anticuerpos maternos pueden ejecutar este efecto inhibitorio en los corderos depende de la concentración de anticuerpos que han sido transferidos y de su vida media (Tizard, 2013), siendo de 11 días para la IgG1, 7 días para la IgG2, 6 días para la IgM y 18 horas para la IgA (Klobasa and Werhahn, 1989). El declive de los anticuerpos maternos coincide con el desarrollo de un sistema inmunitario más competente a nivel de las mucosas, con linfocitos maduros capaces de responder de forma específica contra los antígenos y producir anticuerpos propios. Para que se produzca la maduración del sistema inmunitario de mucosas es imprescindible la exposición y el procesamiento de antígenos lumbales (Kelly and Coutts, 2000). La exposición antigénica tiene lugar mediante la colonización bacteriana de las mucosas, la ingesta de alimento, el contacto con los microorganismos del ambiente y las prácticas de vacunación (Gleeson and Cripps, 2004), mientras que en el transporte de antígenos participan principalmente las células M del epitelio asociado a los folículos de las PP (Mowat and Agace, 2014, Olsen, 2015)

La dieta que reciben los animales en las primeras etapas de su vida influye en la composición de la microbiota que coloniza las mucosas y en la maduración del eje HPA,

y ambos factores contribuyen al desarrollo del sistema inmunitario. La lactancia natural en cabritos induce una colonización bacteriana del rumen distinta a la de los animales criados con lactorreemplazante (Abecia et al., 2014, Abecia et al., 2017), pudiendo promover una estimulación antigénica distinta de su sistema inmunitario (Gleeson and Cripps, 2004). Los cabritos que son alimentados por sus madres presentan en el líquido ruminal una comunidad bacteriana más diversa y con una estructura diferente a la de los animales criados por lactancia artificial, aunque estos cambios no se asocian con diferencias en la expresión local de TLRs o en la concentración plasmática de IgA (Abecia et al., 2017). Asimismo, los corderos que consumen leche materna tienen una mayor actividad del sistema de complemento y una mayor concentración plasmática de IgG que aquellos que reciben lactorreemplazante (Altiner et al., 2005, Hernández-Castellano et al., 2015a, Hernández-Castellano et al., 2015b). Los estudios en niños lactantes han revelado que la lactancia natural favorece un mayor desarrollo del timo, una mejor respuesta inmunitaria frente a algunas vacunas (Palmer, 2011) y unas concentraciones más elevadas de IgA secretada en orina (Goldblum et al., 1989). La lactancia natural puede favorecer el desarrollo del sistema inmunitario promoviendo el establecimiento y el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas para la salud, como las bifidobacterias y las bacterias ácido lácticas (Kelly and Coutts, 2000, Isolauri et al., 2001). Además, en el régimen de lactancia artificial, los corderos se crían separados de sus madres, de manera que no están expuestos a los mismos microorganismos ambientales y tampoco reciben aprendizaje social materno, lo que puede afectar a su comportamiento alimentario (De Paula Vieira et al., 2012).

Pese a la importancia que puede tener la restricción de alimento durante la lactancia sobre el desarrollo del sistema inmunitario, condicionando la salud y la resistencia a enfermedades a largo plazo, los estudios en rumiantes aún son muy escasos. Una

deficiente ingesta de proteína en esta temprana etapa de crecimiento puede alterar el patrón de colonización bacteriana e interferir en la maduración de todos los tejidos y órganos, incluyendo los del sistema inmunitario como el timo y el GALT (Roux et al., 2008). Conviene destacar que la desnutrición proteico-energética está reconocida como la principal causa de inmunodeficiencia en la especie humana, aumentando el riesgo de mortalidad infantil por infecciones gastrointestinales (Woodward, 1998). La desnutrición infantil favorece la atrofia del timo y de las vellosidades intestinales y reduce el grosor de la mucosa intestinal, aumentando la permeabilidad del epitelio (Campbell et al., 2003, Amadi et al., 2009, Rytter et al., 2014), aunque las alteraciones morfológicas del timo pueden revertirse cuando se restaura la alimentación (Chevalier et al., 1998). Se ha descrito que la desnutrición infantil puede afectar tanto a la inmunidad innata -función fagocítica, producción de citoquinas, sistema de complemento- como a la adquirida -mediada por células y producción de anticuerpos- (Chandra, 2004, Rytter et al., 2014). Frecuentemente, los estudios señalan que la desnutrición ocasiona un mayor impacto sobre la inmunidad celular que sobre la humoral (Roux et al., 2008, Paul and Dey, 2015). Según la “hipótesis de tolerancia”, la depresión en la inmunidad celular que causa la desnutrición puede ser un mecanismo de adaptación del organismo para prevenir la aparición de reacciones autoinmunes (Monk et al., 2011).

2.5.5.1. Efectos sobre la inmunidad innata

Los estudios que han investigado los efectos de la restricción alimentaria durante la fase de lactancia sobre la expresión génica de los TLRs todavía son insuficientes. En cerdos se ha descrito que la restricción de alimento en esta etapa puede favorecer un aumento en la expresión del TLR-9 en el íleon (Hu et al., 2015).

Respecto a la producción de citoquinas, la desnutrición infantil en humanos favorece la expresión de citoquinas proinflamatorias y disminuye las antiinflamatorias en el

intestino delgado (Campbell et al., 2003, Amadi et al., 2009). En el colon de ratas restringidas durante la lactancia también se ha observado un patrón de citoquinas similar (dos Santos-Junior et al., 2016). El aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias puede deberse a que los niños y ratas desnutridas están más expuestos a bacterias patógenas en el intestino. La producción excesiva de IFN- γ bloquea la señalización de TGF- β (Ulloa et al., 1999), pudiendo favorecer la inflamación de la mucosa intestinal (Strober et al., 1997) y la permeabilidad del epitelio (Campbell et al., 2003). Los niños desnutridos se caracterizan por una predominante respuesta Th2, con disminuidas concentraciones de las citoquinas proinflamatorias en la sangre (Rytter et al., 2014), al contrario de lo que sucedía en el intestino, aunque se desconoce el mecanismo implicado.

La desnutrición proteico-energética en terneros lactantes también disminuye la actividad de la citoquina proinflamatoria IL-2 en sangre periférica, reflejando probablemente una pérdida de función de los linfocitos T CD4⁺, y solo se recupera tras un periodo de realimentación (Griebel et al., 1987).

2.5.5.2. Efectos sobre la inmunidad celular

La nutrición limitada en ratas durante el periodo de lactancia disminuye los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ pero aumenta los porcentajes de células inmaduras en las PP (Fló et al., 1993, Fló et al., 1994), aunque estos efectos pueden revertirse cuando se restaura la alimentación (Fló et al., 1996). De manera similar, en ratones recién destetados y expuestos a condiciones de desnutrición se ha detectado una mayor abundancia de linfocitos T inmaduros en sangre y tejido linfoide (Woodward et al., 1999, ten Bruggencate et al., 2001). Las alteraciones observadas en la inmunidad celular tras una ingesta restringida de leche pueden estar relacionadas con un alargamiento del ciclo

celular y una menor proliferación de las células precursoras de los linfocitos en la médula ósea (Betancourt et al., 1992, Gómez et al., 1996).

La desnutrición infantil se ha asociado a menudo con una baja ratio de linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ en la sangre, aunque este hallazgo no es constante (Woodward, 1998) y puede estar más relacionado con la existencia, en algunos casos, de infecciones secundarias (Rytter et al., 2014). También se ha descrito durante la desnutrición infantil un aumento en el número de linfocitos T infiltrados en la lámina propia del intestino delgado (Campbell et al., 2003, Amadi et al., 2009), pudiendo estar involucrados en la patogenia de enfermedades inflamatorias como la enteropatía tropical (Veitch et al., 2001).

En terneros, la desnutrición proteico-energética durante la lactancia provoca linfopenia y una menor proliferación de linfocitos (Griebel et al., 1987), revirtiéndose cuando se corrige la alimentación. En cambio, cuando se restringe la ingesta de lactorreemplazante, pero se mantienen cubiertas las necesidades de mantenimiento, los porcentajes de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ o gamma-delta sanguíneos no sufren alteraciones significativas (Nonnecke et al., 2003, Foote et al., 2007), sugiriendo que el desarrollo de la inmunidad celular no se ve comprometido.

2.5.5.3. Efectos sobre la inmunidad humoral

Varios estudios han revelado que las ratas con una alimentación restringida durante la lactancia poseen un menor porcentaje de linfocitos B maduros y células positivas a IgA (IgA⁺) en las PP, así como una menor concentración de IgA secretada en el fluido intestinal (Fló et al., 1993, Fló et al., 1994, Fló et al., 1996). Además, las ratas con acceso restringido a la leche materna secretan menos IgA en el intestino después de ser inmunizadas oralmente (Fló et al., 1993), desapareciendo estas alteraciones en la

inmunidad humoral después de varias semanas de realimentación (Fló et al., 1996). En cambio, cuando la restricción de alimento en roedores tiene lugar después del destete, se ha descrito una mayor activación de los linfocitos B en las PP (Manhart et al., 2000), un aumento del número de células teñidas con anticuerpos específicos de linfocitos B y de IgA en la lámina propia del intestino (Nayak et al., 2009), así como un incremento en la capacidad de las células plasmáticas para secretar mayores cantidades de esta inmunoglobulina (Rho et al., 2017).

Durante la desnutrición infantil se ha observado una disminución en el número de linfocitos B y células plasmáticas en el intestino delgado (Chandra, 1983, Campbell et al., 2003), una reducida secreción de IgA en saliva, lágrimas y lavados nasales y menores títulos de anticuerpos tras la vacunación (Roux et al., 2008, Rytter et al., 2014). La disminución en la secreción de esta inmunoglobulina puede obedecer a diferentes causas, como son una reducción en la expresión local de citoquinas antiinflamatorias (TGF- β , IL-10) que favorezcan su síntesis (Campbell et al., 2003), un menor número de células plasmáticas productoras de IgA en la lámina propia (Kaschula et al., 1979, Green and Heyworth, 1980, Lara-Padilla et al., 2011) o un reducido transporte de IgA al lumen intestinal a través del receptor polimérico de inmunoglobulina (Suárez-Souto et al., 2012, Rho et al., 2017). Paradójicamente, las concentraciones sanguíneas de IgA suelen aparecer elevadas en situaciones de desnutrición infantil (Roux et al., 2008, Rytter et al., 2014), coincidiendo con el incremento de las citoquinas antiinflamatorias en plasma. Algunos autores han sugerido que el aumento en los valores plasmáticos de IgA durante la desnutrición puede deberse a la presencia de infecciones (Roux et al., 2008), mientras que otros lo han relacionado con la reducida secreción de IgA en las mucosas y la acumulación de su forma polimérica a nivel sistémico (Rho et al., 2017).

En terneros, la alimentación restringida durante la lactancia artificial no parece perjudicar a la inmunidad humoral en sangre periférica puesto que no modifica los porcentajes de linfocitos B circulantes ni la concentración de anticuerpos en esta fase (Pollock et al., 1994, Hammon et al., 2002, Nonnecke et al., 2003, Foote et al., 2007, Schäff et al., 2016). Sin embargo, la respuesta inmunitaria humoral en suero tras inmunización puede verse aumentada (Pollock et al., 1994) o disminuida si la desnutrición es más severa (Fiske and Adams, 1985, Griebel et al., 1987).

3. Origen de la salud y la enfermedad durante el desarrollo

(DOHaD)

La alimentación restringida en las fases más tempranas de la vida afecta a la respuesta inmunitaria en el momento en que tiene lugar la restricción, tal y como se ha comentado en el apartado anterior, y también puede inducir efectos a largo plazo sobre la salud y el metabolismo, al promover alteraciones persistentes en la estructura o en la función de las células y de los tejidos (Barker, 2007).

3.1. Definición y concepto

Situaciones adversas como una alimentación inadecuada en etapas críticas del desarrollo fetal y posnatal pueden contribuir a la aparición de enfermedades crónicas en la edad adulta. Siguiendo este razonamiento, la hipótesis del origen de la salud y la enfermedad durante el desarrollo (DOHaD) propone que el riesgo a padecer a largo plazo enfermedades crónicas se inicia a partir de respuestas adaptativas del feto o el recién nacido a un ambiente desfavorable (Gluckman et al., 2008). Para que se produzcan estas respuestas adaptativas se inducen cambios estables en la expresión de los genes, que están mediados probablemente por mecanismos epigenéticos (Meyer et al., 2012).

La epigenética comprende el estudio de cambios heredables en la expresión génica que no están relacionados con alteraciones en la secuencia del ADN, es decir, son modificaciones producidas a nivel fenotípico y no en el genotipo. Los principales mecanismos epigenéticos conocidos son la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas y los cambios en la expresión de los microARNs (Ruchat et al., 2014).

Los cambios epigenéticos se producen de forma natural al avanzar la edad y son sensibles a factores ambientales como la dieta recibida en etapas tempranas de la vida. Comprender cómo se pueden dirigir favorablemente estos cambios a partir de la alimentación es importante porque pueden afectar a la expresión del potencial genético de los animales, influyendo a largo plazo sobre la eficiencia de utilización de los nutrientes y el rendimiento productivo (Meyer et al., 2012). Sin embargo, los estudios en rumiantes que relacionen la nutrición en edades tempranas de la vida con cambios a nivel epigenético aún son escasos. Concretamente en la especie ovina se ha observado que alimentar a hembras gestantes con una ración de bajo contenido en proteína disminuye la metilación de los genes del feto involucrados en el crecimiento y composición corporal, provocando alteraciones en la expresión de estos genes en los tejidos del feto (Lan et al., 2013). Los primeros estudios en este campo se centraron en documentar las consecuencias de la desnutrición materna durante la gestación sobre la salud de la prole, describiéndose efectos perjudiciales en varias especies (humanos, ovejas, cerdos y roedores). Actualmente se sabe que la sobrealimentación en esta etapa puede resultar igualmente nociva para el feto durante la gestación (Wang et al., 2010a) y después del nacimiento (Khanal et al., 2014). El impacto de la desnutrición materna sobre la prole es dependiente del tejido u órgano estudiado, el momento en que tenga lugar la restricción de alimento y el sexo (Gardner et al., 2005, Poore et al., 2007, Poore et al., 2014), así

como de la alimentación recibida inmediatamente después de la restricción (Khanal et al., 2014, Khanal et al., 2015).

3.2. Restricción alimentaria en la gestación

La desnutrición materna durante la gestación en la especie humana se ha asociado con una restricción del crecimiento fetal intrauterino, un menor peso al nacimiento y una mayor probabilidad de desarrollar síndrome metabólico en edades más avanzadas (Hales and Barker, 2001). El término “síndrome metabólico” agrupa a un conjunto de síntomas que incluyen principalmente la intolerancia a la glucosa, la resistencia a la insulina, la hipertensión arterial, un perfil lipídico anormal (aumento de las concentraciones de triglicéridos y descenso de las lipoproteínas de alta densidad) y la obesidad abdominal (Martínez De Morentín et al., 2003). Las personas que padecen este síndrome presentan un mayor riesgo de sufrir diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular.

Asimismo, la alimentación restringida durante la gestación puede activar prematuramente el sensible eje HPA del feto y modificar de manera permanente las interacciones entre el sistema neuroendocrino y el sistema inmunitario (Palmer, 2011). De hecho, la exposición del feto a elevadas concentraciones de glucocorticoides se ha asociado con alteraciones en parámetros inmunitarios del timo, una disminución en la respuesta inflamatoria y un mayor riesgo de padecer enfermedades infecciosas y crónicas (Palmer, 2011).

3.2.1. Efectos sobre el metabolismo energético

Uno de los casos más estudiados sobre los efectos metabólicos a largo plazo de la desnutrición fetal es el de la hambruna holandesa durante el invierno de 1944, como consecuencia de la segunda guerra mundial. Los niños que estuvieron expuestos *in utero* a esta restricción nutritiva, aunque recibieron una adecuada alimentación durante su

infancia, presentaron un mayor riesgo de padecer enfermedades crónicas de tipo cardiovascular o metabólico en la edad adulta (Hales and Barker, 2001, Roseboom et al., 2011).

La disminución en el peso al nacimiento no es siempre un hallazgo constante, puesto que puede no verse afectado si el déficit de nutrientes tiene lugar en una fase temprana de la gestación (Ford et al., 2007). En todo caso, los corderos nacidos con bajo peso pueden presentar un peor ritmo de crecimiento y una mayor mortalidad durante las primeras etapas de vida en comparación con los corderos con mayor peso de nacimiento (Greenwood et al., 1998, McCoard et al., 2017), perjudicando gravemente el rendimiento económico de las explotaciones ganaderas. Asimismo, se han descrito alteraciones similares al síndrome metabólico humano en la descendencia de ovejas que recibieron una alimentación insuficiente durante la gestación, como el desarrollo de resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa (Gardner et al., 2005), hipertensión arterial (Hawkins et al., 2000), engrasamiento visceral (De Blasio et al., 2007) o dislipidemia (Khanal et al., 2014). La desnutrición fetal ocurre principalmente en sistemas de explotación extensivos, cuando en determinados periodos del año se reduce de manera natural la disponibilidad o la calidad del alimento. En estas condiciones, las alteraciones metabólicas de la progenie restringida durante la gestación no se asocian necesariamente con una menor ADG posnatal (Ford et al., 2007, Hoffman et al., 2016) y parece que podría depender del momento del desarrollo en que se encuentran los animales de cada estudio. De hecho, George et al. (2012) describió que la progenie de ovejas restringidas durante la primera mitad de la gestación tenía un mejor índice de conversión cuando se alimentó *ad libitum* a los 6 años de edad, pese a que presentara resistencia a la insulina y acumulación de grasa en el hígado. Los autores del estudio asociaron esta mayor eficiencia alimentaria con un incremento en la capacidad de gluconeogénesis hepática y concluyeron que podía

representar un riesgo para el desarrollo de obesidad (George et al., 2012). No obstante, es conveniente señalar que a esa edad las ovejas ya habían dejado de crecer y solamente podían acumular grasa, mientras que, en animales en crecimiento, la ganancia de peso basada en el depósito de grasa es menos eficiente que la obtenida con el depósito de proteína (Mitchell and Scholz, 2008).

El metabolismo energético del feto ovino puede verse alterado cuando la restricción de alimento tiene lugar durante la periconcepción (Oliver et al., 2001, Rumball et al., 2009), entre los 28 y 78 días de gestación (Ford et al., 2007, Sebert et al., 2009) o en las últimas seis semanas antes del parto (Gardner et al., 2005, Kongsted et al., 2014, Dellschaft et al., 2015). Los corderos que estuvieron desnutridos *in utero* desarrollaron resistencia a la insulina, que se define como una disminución en la capacidad de la insulina para mantener la homeostasis de la glucosa. La reducción en la actividad de la insulina en los tejidos sensibles a esta hormona conduce a una elevación de las concentraciones sanguíneas de glucosa (hiperglucemia). Con el fin de metabolizar mejor la glucosa, las células del páncreas aumentan la secreción de insulina y en consecuencia se elevan sus concentraciones plasmáticas (hiperinsulinemia). La resistencia a la insulina puede persistir incluso cuando las ovejas son adultas, pese a que reciban una ración adecuada (Gardner et al., 2005, Kongsted et al., 2014). Cuando el aumento en la secreción de insulina es insuficiente para mantener los niveles plasmáticos de glucosa dentro de la normalidad, los corderos desarrollan intolerancia a la glucosa (Gardner et al., 2005, Ford et al., 2007).

Debido a que la insulina es una hormona lipogénica (promueve el depósito de grasa), la resistencia a la insulina está estrechamente relacionada con la aparición de obesidad abdominal y esteatosis hepática o hígado graso. De hecho, los corderos nacidos de madres desnutridas durante la gestación pueden presentar a largo plazo un mayor grado de

engrasamiento visceral (De Blasio et al., 2007, George et al., 2012, Nielsen et al., 2013, Khanal et al., 2014). La tendencia a un mayor depósito de tejido adiposo también se ha asociado con cambios en el comportamiento alimentario de los corderos (Peter et al., 2017), incrementándose el apetito por las raciones ricas en grasas (Nielsen et al., 2013). Esta hiperfagia puede aparecer como consecuencia del desarrollo de resistencia a la leptina, una hormona que se sintetiza fundamentalmente en los adipocitos y se encarga de reducir la sensación de hambre a nivel hipotalámico (De Blasio et al., 2010, Lizarraga-Mollinedo et al., 2015). Pese a que los corderos nacidos de ovejas desnutridas durante la gestación presentan una mayor expresión de leptina en el tejido adiposo y una mayor concentración sanguínea de esta hormona, su apetito no se ve disminuido (De Blasio et al., 2010), lo que podría ser indicativo del desarrollo de resistencia frente a la leptina.

La desnutrición fetal durante la gestación ovina si se acompaña después del nacimiento con una ración rica en carbohidratos y grasas puede favorecer la aparición de hipercolesterolemia en los animales adultos (Khanal et al., 2014, Khanal et al., 2016), probablemente debido a modificaciones epigenéticas en los genes implicados en el metabolismo del colesterol (Sohi et al., 2011). La hipercolesterolemia conduce a una excesiva acumulación intracelular de colesterol, promoviendo alteraciones en la permeabilidad de membrana, estrés oxidativo, inflamación crónica –aumenta la señalización de TLRs y la proliferación de monocitos y neutrófilos– e incrementa el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis (Kleemann and Kooistra, 2005, Tall and Yvan-Charvet, 2015).

Finalmente, cabe destacar que la restricción de alimento durante la primera mitad de la gestación ovina promueve un aumento en el grosor de la musculatura del ventrículo cardiaco fetal (Vonnahme et al., 2003, Dong et al., 2005) y un incremento de la presión arterial en los primeros meses de vida (Hawkins et al., 2000), que puede mantenerse en

la edad adulta (Gopalakrishnan et al., 2004). La hipertrofia del ventrículo cardiaco puede ser una respuesta adaptativa al aumento de la resistencia vascular periférica y de la viscosidad de la sangre que ocasiona la restricción en el crecimiento intrauterino (Galan et al., 1998) y que conduce a una elevada poscarga, es decir, a un aumento de la presión que debe ejercer el ventrículo para expulsar la sangre hacia los vasos sanguíneos. En la hipertrofia ventricular pueden estar implicados varios mecanismos, como un aumento en la expresión de los receptores del IGF en los ventrículos (Dong et al., 2005) y alteraciones a nivel mitocondrial, que inducen la utilización de glucosa en lugar de ácidos grasos en el metabolismo cardiaco (Wai et al., 2015). Por otra parte, la hipertensión arterial descrita en la progenie adulta que estuvo restringida durante la gestación podría programarse a través de una disminución en el número de nefronas y de alteraciones en el sistema renina-angiotensina en los riñones (Woods et al., 2001, Gilbert et al., 2005).

3.2.2. Efectos sobre la respuesta inmunitaria

La restricción alimentaria durante la gestación, además de promover alteraciones persistentes en el metabolismo energético, puede afectar a largo plazo a la respuesta inmunitaria de la progenie. En este sentido, se ha observado que cabritos de 6 semanas de edad que habían estado desnutridos durante la gestación presentaban una mayor concentración de IL-6 en sangre periférica tras la exposición a lipopolisacárido (He et al., 2014), por lo que podrían ser más sensibles a las infecciones bacterianas. También se ha descrito un aumento en la expresión de los TLRs en el timo y una mayor producción de IgA en suero tras sensibilización con ovoalbúmina en corderas de 5 meses de edad que habían estado restringidas en la etapa prenatal (Wooldridge et al., 2014, Chadio et al., 2016). Los autores de los estudios anteriores propusieron que el aumento en la expresión de TLRs en el timo y en la producción de IgA sérica pueden ser una estrategia del sistema inmunitario para compensar la alimentación deficiente y favorecer la supervivencia.

Además, estos parámetros inmunitarios no se vieron modificados en los machos restringidos, sugiriendo que los efectos de la restricción prenatal de alimento sobre el sistema inmunitario de los corderos varían dependiendo del sexo.

3.3. Restricción alimentaria en la lactancia

Además de la gestación, el régimen de alimentación durante la lactancia puede condicionar la salud y el rendimiento productivo de los animales tanto a corto como a largo plazo (Moallem et al., 2010, Ballou et al., 2015), probablemente a través de mecanismos epigenéticos (Ruchat et al., 2014). En este sentido, la lactancia materna facilita la transferencia de compuestos bioactivos (péptidos, hormonas, citoquinas y microARNs) que afectan al desarrollo de los recién nacidos (Bartol et al., 2013). Por ejemplo, los microARNs que contiene la leche materna pueden ser absorbidos por las crías e inducir cambios en la metilación del ADN, modificando la expresión de genes involucrados en regular la transcripción, el metabolismo y la actividad del sistema inmunitario (Munch et al., 2013). En consecuencia, una ingestión restringida de leche y de estos compuestos bioactivos puede alterar de forma duradera la expresión de genes importantes en el metabolismo y en la respuesta inmunitaria (Hammon et al., 2018) y aumentar la susceptibilidad a padecer enfermedades o trastornos metabólicos en etapas posteriores de la vida (Ruchat et al., 2014).

Habitualmente, en las explotaciones de ganado vacuno lechero se separa a los recién nacidos de las madres y se limita la cantidad de lactorreemplazante que, aportado en dos tomas diarias, pueden ingerir durante la lactancia (Hammon et al., 2002). Este método de crianza contrasta con las características de la lactancia natural, en la que los animales tienen libre acceso a la leche materna y maman entre cuatro y ocho veces al día (Odde et al., 1985). De hecho, aunque los terneros que ingieren lactorreemplazante en cantidades restringidas tienen cubiertas sus necesidades de mantenimiento y pueden crecer con

normalidad, suelen mostrar comportamientos indicadores de hambre, como un mayor número de vocalizaciones (Thomas et al., 2001) o de visitas al comedero (Hammon et al., 2002, Korst et al., 2017, Gerbert et al., 2018).

La lactancia artificial restringida continúa siendo una práctica común en las explotaciones ganaderas porque reduce los costes de alimentación (Quigley et al., 2006) y estimula a los animales lactantes a que comiencen a ingerir antes pienso y a que se desarrolle su rumen, acelerando así el proceso de destete (Kamiya et al., 2009, Khan et al., 2011). En contra de esta tendencia, varios estudios recientes en terneros han demostrado que aumentar el nivel de ingestión durante la lactancia favorece el bienestar de los animales (Khan et al., 2007, Todd et al., 2017) y puede tener efectos beneficiosos después del destete adelantando el inicio de la pubertad y aumentando el rendimiento lechero cuando se compara con el método de lactancia convencional (Shamay et al., 2005, Moallem et al., 2010, Soberon et al., 2012, Silper et al., 2014). No obstante, este tipo de manejo presenta algunos inconvenientes, como son la reducción en la ingesta de alimento sólido durante el destete y el retraso en el desarrollo del rumen, aunque pueden evitarse si el destete se realiza de manera progresiva (Khan et al., 2007, Schäff et al., 2018).

3.3.1. Efectos sobre el metabolismo energético y proteico

En rumiantes, la ingestión de lactorreemplazante en cantidades restringidas durante las primeras semanas de vida puede provocar cambios significativos en las concentraciones plasmáticas de parámetros relacionados con el metabolismo energético (Smith et al., 2002). En general, se han hallado menores niveles de IGF-I, insulina, glucosa y triglicéridos, así como mayores concentraciones de ácidos grasos no esterificados (NEFA) y beta-hidroxibutirato (BHB) durante la fase de lactancia de terneros con acceso restringido a lactorreemplazante en comparación con aquellos alimentados *ad libitum* (Schäff et al., 2016, Frieten et al., 2017, Kesser et al., 2017). Greenwood et al. (2002)

también observó menores concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina e IGF-I en corderos lactantes que se criaban con cantidades limitadas de lactorreemplazante. Estos resultados son similares a los observados en ovejas con alimentación restringida durante el final de la gestación (Gao et al., 2007, Cal-Pereyra et al., 2015) y ovejas maduras no gestantes ni en lactación alimentadas por debajo de sus necesidades de mantenimiento (Caldeira et al., 2007).

La insulina es una hormona anabolizante cuya concentración suele hallarse disminuida en plasma cuando se restringe el contenido energético de la ración (Chilliard et al., 1998). En estas circunstancias, los nutrientes ingeridos no son suficientes para cubrir las demandas del organismo y se instaura un balance energético negativo, que se caracteriza por el aumento en la gluconeogénesis hepática, la disminución en la absorción de glucosa en los tejidos periféricos, el incremento del catabolismo lipídico en el tejido adiposo y el aumento de la movilización de aminoácidos desde el músculo (Haspolat et al., 2007, Tygesen et al., 2008). Mediante la lipólisis del tejido adiposo se liberan NEFA, que son oxidados en el hígado produciendo cuerpos cetónicos como el BHB, elevándose consecuentemente las concentraciones plasmáticas de ambos parámetros (Chilliard et al., 1998, Tygesen et al., 2008).

Los cambios observados durante la lactancia restringida en las concentraciones sanguíneas de glucosa, insulina, triglicéridos y BHB desaparecen una vez que los animales vuelven a recibir un nivel de alimentación similar (Maccari et al., 2015, Schäff et al., 2016, Frieten et al., 2017, Kesser et al., 2017), al igual que sucede en ovejas adultas cuando son realimentadas tras un periodo de restricción de alimento (Sahoo et al., 2009, Pulina et al., 2012). Sin embargo, existe controversia respecto a la concentración de NEFA, puesto que algunos autores han observado que disminuye semanas después de que finalice la restricción (Schäff et al., 2016, Frieten et al., 2017), mientras que otros no han

hallado cambios (Maccari et al., 2015). Estas diferencias pueden deberse a que la restricción alimentaria tuvo una duración mayor en los estudios de Schäff et al. (2016) y Frieten et al. (2017). Las menores concentraciones de adiponectina halladas en terneros restringidos durante las 4 primeras semanas de vida permanecen disminuidas hasta los 110 días de edad y pueden modificar la sensibilidad de la insulina en los tejidos (Kesser et al., 2017). Además, el menor número de islotes y de áreas teñidas de insulina en el páncreas de terneros de 8 meses de edad que tuvieron acceso restringido a lactorreemplazante (Prokop et al., 2015) sugiere que la restricción temprana de alimento puede afectar al equilibrio entre la proliferación y la apoptosis de las células pancreáticas y modificar persistentemente la capacidad de secretar insulina. Estos resultados, por tanto, son indicativos de que la restricción de alimento en la fase de lactancia puede inducir alteraciones a largo plazo en el metabolismo de la insulina similares a las descritas en el síndrome metabólico. De hecho, diversos estudios en medicina humana han encontrado una mayor incidencia de resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa (síntomas compatibles con el síndrome metabólico) en adultos que habían estado desnutridos durante los primeros años de vida (González-Barranco et al., 2003, Francis-Emmanuel et al., 2014).

La ingestión de cantidades excesivas de lactorreemplazante durante la lactancia puede ser igualmente perjudicial, ya que se ha asociado en terneros lechales con la aparición de resistencia a la insulina, hiperglicemia y glucosuria (Hostettler-Allen et al., 1994, Hugi et al., 1997). En ovino, aumentar la ingestión de macronutrientes durante las dos primeras semanas de vida también puede promover efectos a largo plazo en el metabolismo energético, que varían en función del sexo (Berry et al., 2016, Jaquier et al., 2016). Los corderos que habían recibido un suplemento calórico al principio de la lactancia presentaron a los 4 meses de edad una mayor secreción de insulina tras la administración

intravenosa de glucosa, mientras que en las hembras la secreción de esta hormona se hallaba disminuida (Jaquier et al., 2016). A los 14 meses de edad, los machos que recibieron la suplementación se caracterizaron por un menor peso corporal y una menor concentración de insulina en ayunas (Berry et al., 2016). Los autores asociaron estas persistentes alteraciones en el metabolismo energético con cambios epigenéticos en las células pancreáticas.

Por otra parte, al reducirse severamente la ingesta de proteína en rumiantes pueden detectarse menores concentraciones plasmáticas de proteínas totales y particularmente de albúmina porque disminuyen los aminoácidos disponibles para su síntesis y se incrementa la utilización de los mismos en la gluconeogénesis hepática (Hornick et al., 2000, Caldeira et al., 2007, Sahoo et al., 2009). También es posible observar en ocasiones una disminución en la concentración plasmática de urea (Yambayamba et al., 1996, Lérias et al., 2015), debido a que, ante la menor ingesta de nitrógeno, puede disminuir la excreción renal de nitrógeno e incrementarse el reciclaje de urea hacia el rumen (Chilliard et al., 1998). De acuerdo con esta explicación, varios estudios han señalado que administrar cantidades restringidas de lactorreemplazante a corderos y terneros disminuye la concentración plasmática de urea (Greenwood et al., 2002, Quigley et al., 2006, Maccari et al., 2015). No obstante, otros autores que han comparado diferentes niveles de ingestión durante la lactancia no han encontrado efectos sobre la concentración sanguínea de este parámetro (Hammon et al., 2002, Smith et al., 2002, Kamiya et al., 2009) o incluso lo han hallado más elevado en los animales criados con el régimen de alimentación restringida (Schäff et al., 2016, Frieten et al., 2017), atribuyéndolo en este último caso a un incremento en el catabolismo de aminoácidos durante el balance energético negativo.

En casos de restricción alimentaria severa puede incrementarse el nivel de creatinina en plasma, motivado por un aumento en su producción fruto del catabolismo muscular

(Sahoo et al., 2009, Lérias et al., 2015). No obstante, la movilización de proteína muscular durante periodos de restricción alimentaria moderada se encuentra limitada en los rumiantes gracias a la utilización de NEFA y cuerpos cetónicos, en lugar de glucosa y acetato, como fuente de energía (Chilliard et al., 1998, Hornick et al., 2000). De hecho, diversos estudios variando el nivel de ingestión de lactorreemplazante en terneros no han hallado diferencias en las concentraciones sanguíneas de proteína total (Quigley et al., 2006, Kesser et al., 2017, Ollivett et al., 2012, Maccari et al., 2015) o creatinina (Hammon et al., 2002) durante la lactancia. En algunos casos se han descrito menores concentraciones plasmáticas de albúmina o de proteína total durante la fase de lactancia en los terneros que reciben lactorreemplazante *ad libitum* en comparación con los alimentados de manera restringida (Hammon et al., 2002, Schäff et al., 2016, Gerbert et al., 2018), debido probablemente a que la mayor ingesta de lactorreemplazante del grupo *ad libitum* causó un efecto de dilución en los niveles plasmáticos de albúmina y proteína total. Únicamente Maccari et al. (2015) encontró concentraciones más bajas de albúmina en terneros lactantes restringidos frente a los que recibieron lactorreemplazante *ad libitum*, atribuyéndolo a diferencias en el nivel de ingestión de proteína entre los dos grupos. En cualquier caso, los efectos descritos sobre los anteriores parámetros durante la ingestión restringida de lactorreemplazante no persistieron en estos estudios una vez que los animales recibieron el mismo nivel de alimentación (Maccari et al., 2015, Schäff et al., 2016, Gerbert et al., 2018).

3.3.2. Efectos sobre la función hepática y el estrés oxidativo

El nivel de ingestión durante la lactancia también puede modificar las concentraciones sanguíneas de parámetros indicadores de inflamación, estrés oxidativo y función hepática. Los terneros restringidos durante la lactancia presentan un mayor nivel de fibrinógeno en esta fase que los alimentados *ad libitum*, desapareciendo este efecto cuando se iguala el

plano nutricional (Schäff et al., 2016, Frieten et al., 2017, Gerbert et al., 2018). Las citoquinas proinflamatorias inducen un aumento transitorio de las concentraciones sanguíneas de las APP+ como el fibrinógeno (Bertoni and Trevisi, 2013), por lo que la elevación de este parámetro puede ser indicador de un peor estado sanitario en los animales restringidos en la lactancia. La concentración plasmática de haptoglobina, otra APP+ involucrada en la inflamación, no suele verse afectada por el nivel de alimentación durante la lactancia (Obeidat et al., 2013, Schäff et al., 2016, Gerbert et al., 2018), aunque Ballou et al. (2015) detectaron un incremento de la haptoglobina en los terneros que ingerían menos lactorreemplazante. La restricción alimentaria durante la lactancia también puede aumentar la concentración plasmática de bilirrubina de los terneros en esta fase (Frieten et al., 2017). El incremento en la concentración de bilirrubina se atribuye principalmente a una reducida síntesis de las enzimas hepáticas responsables de su eliminación (Bertoni and Trevisi, 2013) y puede cumplir una función supresora de la respuesta inflamatoria (Vogel and Zucker, 2016).

Los estudios que han valorado en terneros lactantes el efecto del nivel de ingestión de lactorreemplazante sobre las concentraciones plasmáticas de APP- (albúmina, lipoproteínas, proteína de unión al retinol y paraoxonasa, entre otras) se han centrado básicamente en la albúmina, que ya se ha descrito en el apartado de metabolismo proteico. También se ha medido en algunas ocasiones la concentración de colesterol, que es un índice de las concentraciones plasmáticas de las lipoproteínas de origen hepático e intestinal (Bertoni and Trevisi, 2013). En relación al colesterol, los resultados son contradictorios, ya que mientras que algunos autores han descrito que su concentración aumenta durante la ingesta restringida de lactorreemplazante cuando se compara con el régimen *ad libitum* (Hammon et al., 2002, Schäff et al., 2016), otros no han hallado diferencias (Maccari et al., 2015) o incluso han observado una disminución (Frieten et

al., 2017). Probablemente estos resultados están condicionados por las diferencias en el nivel de ingestión de pienso de arranque que se ofrecía *ad libitum* durante la lactancia a todos los terneros. En ratas se ha podido comprobar que la restricción alimentaria materna durante la gestación y la lactancia aumenta los niveles circulantes de colesterol en las crías tanto en la fase de lactancia como en la edad adulta debido a modificaciones epigenéticas (Sohi et al., 2011). Aunque en niños desnutridos se han observado menores concentraciones plasmáticas de colesterol y de lipoproteínas de alta y baja densidad que en niños sanos (Ece et al., 2007), la desnutrición infantil aumenta el riesgo de poseer concentraciones más elevadas de colesterol y lipoproteínas de baja densidad (Wang et al., 2017) y a desarrollar hipertensión en la edad adulta (Wang et al., 2016).

En rumiantes no hay estudios que relacionen el aporte de leche en cantidades restringidas con estrés oxidativo, pero se ha comprobado que la desnutrición materna durante el último tercio de gestación disminuye en el feto ovino la actividad de la SOD y la actividad antioxidante total, y aumenta las concentraciones de MDA (producto de la peroxidación lipídica) en hígado y plasma (Gao et al., 2012, Gao et al., 2013). La disminución en la capacidad antioxidante también ha sido observada en el músculo de corderos de tres meses de edad sometidos a restricción de alimento (Savary-Auzeloux et al., 2008). Asimismo, los niños que padecen desnutrición proteico-energética (Ece et al., 2007) y las ratas con alimentación restringida durante la lactancia muestran daño hepático, disminución de las defensas antioxidantes y estrés oxidativo (Fetoui et al., 2009, Preidis et al., 2015, dos Santos-Junior et al., 2016). Tras seis semanas de recuperación nutricional, la actividad de la SOD de los cabritos con crecimiento intrauterino restringido se incrementó en el timo, pero la actividad de la catalasa continuó mostrándose disminuida en este tejido (He et al., 2012). En cambio, cuando la restricción alimentaria tiene lugar en animales con un estado fisiológico más avanzado, la actividad antioxidante

total en músculo puede recuperarse después de tres semanas de realimentación *ad libitum* (Savary-Auzeloux et al., 2008). Las diferencias observadas entre estos dos estudios apuntan a que la desnutrición en un periodo crítico del desarrollo puede tener un impacto más duradero sobre las defensas antioxidantes a través de cambios epigenéticos. En conjunto, los resultados de estos estudios sugieren que una nutrición deficiente en edades tempranas puede alterar la función hepática, disminuir las defensas antioxidantes del organismo y promover inflamación crónica y estrés oxidativo.

3.3.3. Efectos sobre la respuesta inmunitaria

La desnutrición materna durante la lactancia ovina aumenta la expresión génica de los TLRs en el timo de las crías a los 5 meses de edad (Chadio et al., 2016). En cambio, la administración de una ración hipoproteica a roedores lactantes disminuye en la edad adulta la expresión de TLRs en macrófagos alveolares infectados (Da Costa et al., 2017, de Morais et al., 2017). Tanto el aumento como la disminución en la expresión de los TLRs descritos a largo plazo son indicativos de alteraciones persistentes en la inmunidad innata. Las diferentes respuestas observadas entre los corderos y los roedores pueden deberse a particularidades del sistema inmunitario propias de cada especie, al distinto tejido estudiado o a la infección aplicada a los roedores. El trastorno en la expresión génica de los TLRs puede causar inflamación crónica y disfunción del epitelio intestinal (Abreu, 2010, Piccinini and Midwood, 2010).

Asimismo, restringir la ingestión de lactorreemplazante durante la lactancia perjudica después del destete la capacidad de los terneros para secretar la citoquina proinflamatoria TNF- β en sangre cuando son infectados experimentalmente, lo que implica que estos animales pueden ser más susceptibles a las infecciones (Ballou et al., 2015).

4. Fermentación en el rumen y acidosis ruminal

El rumen alberga una compleja población microbiana capaz de fermentar los carbohidratos de origen vegetal que no pueden ser digeridos por las enzimas propias del animal y obtener energía a partir de ellos (Zeineldin et al., 2018). A través de la fermentación microbiana ruminal se producen ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) y lactato provocando una disminución fisiológica del pH del líquido ruminal después de cada ingesta (González et al., 2012). En condiciones normales el pH ruminal oscila a lo largo del día en un rango entre 5,8 y 6,5, regulándose gracias a la absorción de ácidos en el epitelio ruminal y a su neutralización con las sales minerales (bicarbonato y fosfato) de la saliva (Owens et al., 1998, González et al., 2012).

La acidosis ruminal es una alteración metabólica de origen nutricional que aparece frecuentemente durante el cebo de corderos en sistemas intensivos (Blanco, 2017), pudiendo asimismo presentarse en rebaños lecheros cuando se aportan raciones muy energéticas para aumentar la producción láctea. La acidosis se define como la acumulación por encima de niveles fisiológicos de ácidos orgánicos en el rumen (Nagaraja and Titgemeyer, 2007) y está reconocida como uno de los trastornos más importantes de los rumiantes. Tras la ingesta de raciones ricas en cereales, aumenta la cantidad de carbohidratos no estructurales que pueden fermentarse fácilmente en el rumen y se incrementa la producción de ácidos grasos volátiles, disminuyendo el pH ruminal (Hernández et al., 2014). Además, la secreción de saliva, que ayuda al control del pH ruminal, se reduce durante el consumo de raciones muy concentradas y con poca fibra neutro detergente, contribuyendo a la acidificación del medio ruminal (Plaizier et al., 2018). La acidosis se instaura cuando se supera la capacidad de absorción del epitelio y se almacenan excesivas concentraciones de ácidos en el rumen, pudiendo manifestarse de forma clínica (acidosis aguda) o subclínica (acidosis subaguda).

4.1. Acidosis aguda

Durante la acidosis aguda se acumulan grandes cantidades de ácido láctico en el rumen y el pH disminuye por debajo de 5 debido al sobrecrecimiento de *Streptococcus bovis* y de los lactobacilos anaeróbicos (Nagaraja and Titgemeyer, 2007, Mao et al., 2013, Petri et al., 2013). El descenso del pH reduce la población de bacterias gram negativas y favorece el crecimiento de bacterias gram positivas como *Streptococcus bovis*, debido a que estas últimas son más resistentes al bajo pH (Owens et al., 1998). *Streptococcus bovis* ejerce un papel más destacado en el inicio de la acidosis porque, al producir ácido láctico en grandes cantidades, contribuye a que el pH descienda por debajo de 5, inhibiendo el crecimiento de las bacterias fermentadoras del ácido láctico y posibilitando el predominio posterior de los lactobacilos. La destrucción de la microbiota normal, junto con la entrada de agua de la sangre al rumen (hidrorrumen) provoca una disminución en la concentración total de ácidos grasos volátiles en el líquido ruminal. La acidosis aguda cursa con signos clínicos como anorexia, letargia, deshidratación y diarrea (Minuti et al., 2014) y, si persiste, el lactato puede incorporarse al torrente circulatorio desencadenando una acidosis metabólica sistémica, disminuyendo el bicarbonato y el pH sanguíneo y pudiendo llegar a causar la muerte (Owens et al., 1998, Owens et al., 2007, Hernández et al., 2014).

4.2. Acidosis subaguda

A diferencia de la acidosis aguda, la forma subaguda no exhibe sintomatología clínica (Owens et al., 1998) y se caracteriza por periodos transitorios y repetidos de pH ruminal moderadamente bajo (entre 5 y 5,5) durante los cuales se acumulan ácidos grasos volátiles en el rumen y predominan las bacterias fermentadoras de ácido láctico (Fernando et al., 2010). Entre esta clase de bacterias destacan *Selenomonas ruminantium* y *Megasphaera elsdenii*, que al transformar el ácido láctico en otros ácidos grasos volátiles más

fácilmente absorbibles previenen su acumulación en el rumen (Nagaraja and Titgemeyer, 2007).

La mayoría de estudios que han observado alteraciones en la microbiota comensal del rumen asociadas con la acidosis subaguda se han llevado a cabo con muestras de líquido ruminal. Sin embargo, recientemente también se ha descrito que la acidosis subaguda puede promover cambios en la microbiota epimural (Chen et al., 2012, Wetzels et al., 2015, Wetzels et al., 2017) y en la adherida a partículas de alimento (McCann et al., 2016, Petri et al., 2017). Existe consenso entre los autores en que durante la acidosis subaguda se produce una pérdida de riqueza y de diversidad bacteriana y un incremento en la abundancia del phylum Firmicutes respecto al phylum Bacteroidetes (Mao et al., 2013, Plaizier et al., 2017, Wetzels et al., 2017). Teniendo en cuenta que Bacteroidetes es más eficiente que Firmicutes en la degradación de carbohidratos estructurales (El Kaoutari et al., 2013) y que una elevada riqueza y diversidad microbiana está relacionada con una alta estabilidad y funcionalidad de la microbiota comensal (Russell and Rychlik, 2001, Ley et al., 2006), las alteraciones en las poblaciones bacterianas promovidas por la acidosis subaguda pueden reducir la eficiencia alimentaria de los animales (Plaizier et al., 2017). Otro hecho que fortalece esta teoría es que al descender el pH ruminal se reduce la abundancia de bacterias celulolíticas como *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* y *Butyrivibrio fibrisolvens* (Nagaraja and Titgemeyer, 2007, Fernando et al., 2010, Li et al., 2017), disminuyendo la digestibilidad de la fibra.

La reducción en la ingesta de alimento durante la acidosis subaguda, aunque actúa como un mecanismo compensador para reducir la producción y la acumulación de ácidos y restaurar el pH normal del rumen (Oetzel, 2017), contribuye a disminuir el rendimiento productivo de los animales. La cantidad de grasa producida en la leche también suele hallarse disminuida durante la acidosis subaguda, debido, en parte, a que el pH ácido

puede alterar la biohidrogenación ruminal de ácidos grasos (Bauman and Griinari, 2003), generándose intermediarios que se absorben en el intestino e inhiben la síntesis de grasa en la glándula mamaria (Oetzel, 2007). Pese a los efectos perjudiciales descritos, una acidosis subaguda leve podría resultar beneficiosa desde un punto de vista de eficiencia energética (Owens et al., 1998), puesto que al reducirse la producción de acético también disminuye la síntesis de metano, cuya emisión supone una pérdida de energía (Weimer, 2015).

4.3. Alteraciones y lesiones provocadas por la acidosis

La medición del pH del líquido ruminal es el método de elección para el diagnóstico de acidosis en ausencia de signos clínicos, aunque su sensibilidad y su precisión pueden verse afectadas por la elevada variabilidad del pH ruminal dependiendo del animal, el momento del día y la técnica utilizada (Villot et al., 2018). Por esta razón, es difícil fijar un valor umbral de pH para la detección de las acidosis subagudas y muchos autores recomiendan incluir otros criterios diagnósticos como las alteraciones en la bioquímica sanguínea, la reducción en la ingesta (González et al., 2012) o la disminución del porcentaje de grasa en leche (Plaizier et al., 2018). Asimismo, se han desarrollado sensores ruminales que permiten monitorizar la cinética del pH ruminal y pueden ser muy útiles para ayudar a prevenir la acidosis (Klevenhusen et al., 2014). Junto con el descenso del pH ruminal, en caso de acidosis suele observarse un aumento en la concentración total de ácidos producidos en el rumen y en la proporción de propiónico y una disminución en la proporción de acético y en la relación acético/propiónico.

La acumulación de ácidos y el incremento de la presión osmótica del contenido ruminal induce la entrada rápida de agua (procedente de la sangre) en el rumen y lesiona la pared favoreciendo la formación posterior de abscesos (Owens et al., 1998). Al engrosarse el estrato córneo del rumen (paraqueratosis) para reparar los daños en la pared,

se reduce la capacidad de absorción de ácidos grasos volátiles. Las lesiones de la mucosa ruminal pueden alterar la permeabilidad de la pared, de manera que bacterias como *Fusobacterium necrophorum* y *Arcanobacterium pyogenes* pueden atravesar el epitelio ruminal, incorporarse a la circulación sanguínea y colonizar el hígado generando abscesos a ese nivel (Hernández et al., 2014). Además, en condiciones de acidosis suele detectarse un incremento en las concentraciones de endotoxinas presentes en el líquido ruminal, como el lipopolisacárido libre (Gozho et al., 2007), originadas probablemente a partir de la lisis de las bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Bacteroidetes spp.* (Khafipour et al., 2009, Mao et al., 2013), que al acceder al torrente circulatorio puede desencadenar una respuesta inflamatoria sistémica (Plaizier et al., 2008). Es posible que, como consecuencia de ello, algunos autores hayan descrito en condiciones de acidosis subaguda un incremento a nivel sanguíneo en la expresión del TLR-4 y en las concentraciones de APP+ como la haptoglobina, la ceruloplasmina y el amiloide A sérico (Gozho et al., 2005, Minuti et al., 2014, Stefanska et al., 2018). Asimismo, es posible observar una disminución en la concentración sanguínea de colesterol (Minuti et al., 2014, Trevisi et al., 2014, Khiaosa-ard et al., 2018), debido a la menor expresión de las enzimas involucradas en su síntesis durante el consumo de raciones ricas en cereales (Steele et al., 2011, Steele et al., 2012).

La ingestión de raciones ricas en cereales favorece la llegada al intestino grueso de carbohidratos que no se digieren en el rumen y la fermentación a este nivel puede incrementar el riesgo de acidosis intestinal (Plaizier et al., 2018), dañando el epitelio y alterando la microbiota presente (Ye et al., 2016). Otros problemas que suelen asociarse con la acidosis ruminal son la aparición de diarreas, laminitis (Nocek, 1997) y estrés oxidativo (Karmin et al., 2011, Minuti et al., 2014). Todo ello conduce a que el

rendimiento productivo de los animales pueda verse seriamente comprometido si no se controla de manera adecuada esta alteración metabólica.

4.4. Factores que influyen en la susceptibilidad a la acidosis

Se ha observado que los rumiantes que reciben la misma ración y tienen un nivel de ingestión similar pueden presentar diferente grado de susceptibilidad a la acidosis ruminal, mostrándose más afectados por este trastorno unos animales que otros (Humer et al., 2015, Gao and Oba, 2016, Li et al., 2017, Wetzels et al., 2017). Para valorar a nivel individual la severidad de la acidosis subaguda suelen emplearse diferentes indicadores como el tiempo y el área en que el pH ruminal desciende por debajo de 5,8 (unidades de $\text{pH} \times \text{minutos/día}$), o el índice de acidosis, que es el cociente entre el área de pH inferior a 5,8 y la ingestión diaria de materia seca (Penner et al., 2009b). Los animales considerados más susceptibles a la acidosis presentan durante periodos más prolongados de tiempo un pH ruminal menor a 5,8, así como un área y un índice de acidosis mayor. Entre los posibles factores que puede explicar el potencial riesgo individual a desarrollar acidosis se han propuesto la microbiota comensal, la capacidad de absorción del epitelio y el comportamiento del animal (Chen et al., 2012, González et al., 2012).

Las alteraciones en la microbiota comensal del rumen pueden afectar al sistema inmunitario y a la fermentación de carbohidratos a este nivel favoreciendo la aparición de problemas metabólicos. Recientemente se han descrito diferencias en la diversidad de la microbiota presente en el contenido digestivo y la microbiota epimural entre animales resistentes y susceptibles a la acidosis ruminal (Chen et al., 2012), presentando los corderos de cebo con menor pH ruminal una menor abundancia de bacterias celulolíticas en el líquido ruminal (Li et al., 2017). En cambio, Wetzels et al. (2017) no hallaron diferencias en la diversidad de la comunidad bacteriana epimural entre vacas con distinta respuesta a la acidosis ruminal. Esta discrepancia puede deberse a que la fase

experimental en este último estudio tuvo una duración menor, se empleó una ración con mayor proporción de forraje y un criterio distinto para clasificar a los animales según la severidad de la acidosis ruminal. En el estudio de Chen et al. (2012) también se observó que las vacas más resistentes a la acidosis presentaban una mayor expresión génica de los TLR-2 y -4 en el epitelio ruminal y que la expresión génica del último estaba correlacionada positivamente con las bacterias totales adheridas al epitelio de estos animales. Los autores propusieron que la microbiota epimural del rumen puede estimular la expresión local de los TLRs para proteger al epitelio ruminal de los daños asociados a la acidosis.

Los principales mecanismos de eliminación de los ácidos producidos en el rumen son la absorción a través del epitelio ruminal, la neutralización con tampones y el paso del rumen al intestino (Allen, 1997). Una adecuada absorción de ácidos en el epitelio es fundamental para el mantenimiento del pH ruminal dentro de los límites fisiológicos y para evitar que la acidosis se extienda a otros tramos del tracto gastrointestinal. La capacidad de absorción depende del tamaño y la densidad de las papilas del rumen, contribuyendo un mayor número y longitud de papilas a una absorción más rápida de los ácidos grasos volátiles. Varios autores han sugerido que el menor riesgo de algunos animales a padecer acidosis puede estar relacionado con una mejor capacidad de absorción del epitelio (Penner et al., 2009a, Schlau et al., 2012), mientras que otros no han hallado diferencias en este sentido (Gao and Oba, 2016).

Algunos comportamientos alimentarios asociados con un bajo pH ruminal son una elevada ingestión de materia seca, un rápido ritmo de ingestión, un escaso tiempo dedicado a la masticación y a la rumia y la realización de comidas menos frecuentes al día (González et al., 2012). Un elevado ritmo de ingestión disminuye la insalivación de la comida y la reducción en la actividad de rumia también disminuye la saliva disponible

para tamponar el contenido ruminal (Giger-Reverdin et al., 2014, Kröger et al., 2017). Además, los animales que evitan ingerir las partículas de alimento más largas (forraje) y seleccionan las más finas (concentrado) pueden ser más susceptibles a la acidosis (Gao and Oba, 2014, Nasrollahi et al., 2017, Coon et al., 2019) porque esta conducta favorece que consuman una ración menos equilibrada y que dediquen menos tiempo a la rumia.

4.5. Microbiota epimural y DOHaD

Las bacterias colonizan el tracto gastrointestinal inmediatamente después del nacimiento (Jami et al., 2013), diferenciándose a nivel del rumen en tres subpoblaciones que incluyen la asociada al líquido ruminal, la del contenido sólido y la adherida al epitelio o epimural (Li et al., 2012). La comunidad bacteriana epimural del rumen de los corderos alcanza en poco tiempo concentraciones similares a las de los adultos, mientras que su diversidad experimenta cambios significativos durante las primeras semanas de vida (Mueller et al., 1984, Rieu et al., 1989). A la microbiota epimural del rumen se le atribuyen importantes funciones como la utilización del oxígeno (Cheng et al., 1979), la hidrólisis de la urea (Wallace et al., 1979) y el reciclaje de tejido epitelial (McCoard et al., 2017), pudiendo también estar involucrada en el metabolismo de aminoácidos (Mao et al., 2015) y de los ácidos grasos volátiles (Chen et al., 2012). Además, esta comunidad bacteriana puede colaborar con el sistema inmunitario porque compite contra los microorganismos patógenos que intentan adherirse al epitelio (Wetzels et al., 2015). La colonización microbiana precede al desarrollo funcional y anatómico del rumen, por lo que las alteraciones en la microbiota ruminal durante periodos críticos del desarrollo podrían programar efectos persistentes a largo plazo (Jiao et al., 2015). Además, una vez establecida, la microbiota epimural del rumen es menos susceptible a sufrir cambios debidos a la dieta que la microbiota del contenido (Yáñez-Ruiz et al., 2015).

Desde un punto de vista taxonómico, la microbiota epimural de los rumiantes es diferente a la población bacteriana comensal del lumen y varía a lo largo de todo el tracto gastrointestinal (Malmuthuge et al., 2014, Mao et al., 2015). También se ve influida por otros factores como son la especie animal (Collado and Sanz, 2007), la edad (Jiao et al., 2015) y la alimentación (Chen et al., 2011, Liu et al., 2015a). Entre los factores mencionados, el más decisivo en la constitución de la microbiota ruminal de los animales adultos es la dieta (McCann et al., 2014, Henderson et al., 2015). Varios estudios han sugerido que la microbiota epimural del rumen en los animales adultos se encuentra estrechamente regulada por el hospedador, porque es menos dinámica y más resiliente a los cambios dietéticos que la microbiota de contenido (McCowan et al., 1980, Sadet et al., 2007, Sadet-Bourgeteau et al., 2010, Petri et al., 2013). Esta particularidad de la microbiota adherida al epitelio podría ser aprovechada mediante intervenciones nutricionales aplicadas en animales jóvenes, para modular el establecimiento de una microbiota que sea beneficiosa para el sistema inmunitario, el rendimiento productivo y la resistencia a enfermedades en etapas posteriores de la vida (Yáñez-Ruiz et al., 2015, Zeineldin et al., 2018).

Una limitación que debe tenerse en cuenta es que existe muy poca información sobre la organización del sistema inmunitario en el rumen (Trevisi et al., 2014). El epitelio ruminal no dispone de un tejido linfóide asociado (Sharpe et al., 1977), pero dispone de diversos mecanismos inmunitarios para controlar la población bacteriana comensal, como son el suministro de IgA a partir de la saliva (Subharat et al., 2015), la actividad de los TLRs, las proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos y los péptidos antimicrobianos (Malmuthuge et al., 2012). Se ha comprobado que la suplementación de un pienso de arranque a corderos lactantes modifica la microbiota epimural del rumen, disminuye la expresión génica de varias citoquinas (IL-6, IL-10, IFN- γ) en el epitelio y promueve la

acidificación del pH ruminal y el aumento de las concentraciones de ácidos grasos volátiles (Liu et al., 2017). Aunque estas adaptaciones pueden ser beneficiosas para la maduración del rumen y el proceso de destete, aún se desconoce si pueden contribuir posteriormente a reducir el riesgo de los corderos a desarrollar acidosis ruminal. Tampoco se sabe si las modificaciones que pueden producirse en estos parámetros como consecuencia de la restricción alimentaria en fases tempranas de la vida, como la lactancia, modifican la susceptibilidad de los animales a sufrir acidosis ruminal en la fase de cebo, cuando se suministran raciones ricas en carbohidratos para conseguir un elevado rendimiento productivo.

Referencias

- ABECIA, L., JIMÉNEZ, E., MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, G., MARTÍN-GARCÍA, A. I., RAMOS-MORALES, E., PINLOCHE, E., DENMAN, S. E., NEWBOLD, C. J. & YÁÑEZ-RUIZ, D. R. 2017. Natural and artificial feeding management before weaning promote different rumen microbial colonization but not differences in gene expression levels at the rumen epithelium of newborn goats. *PLoS One*, 12, e0182235.
- ABECIA, L., RAMOS-MORALES, E., MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, G., ARCO, A., MARTÍN-GARCÍA, A. I., NEWBOLD, C. J. & YÁÑEZ-RUIZ, D. R. 2014. Feeding management in early life influences microbial colonisation and fermentation in the rumen of newborn goat kids. *Animal Production Science*, 54, 1449-1454.
- ABREU, M. T. 2010. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function *Nature Reviews Immunology*, 10, 131-144.
- ALLEN, M. S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *Journal of Dairy Science*, 80, 1447-1462.
- ALTINER, A., OZPINAR, A. & ERHARD, M. 2005. Serum immunoglobulin G levels in lambs fed colostrum and dam milk or cow milk and milk replacer after birth. *Medycyna Weterynaryjna*, 61, 1135-1137.
- AMADI, B., FAGBEMI, A. O., KELLY, P., MWIYA, M., TORRENTE, F., SALVESTRINI, C., DAY, R., GOLDEN, M. H., EKLUND, E. A., FREEZE, H. H. & MURCH, S. H. 2009. Reduced production of sulfated glycosaminoglycans occurs in Zambian children with kwashiorkor but not marasmus. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 592-600.
- ANIMAL TASK FORCE 2013. Research & innovation for a sustainable livestock sector in Europe. [Online]. Available: <http://www.animaltaskforce.eu/Portals/0/ATF/horizon2020/ATF%20white%20paper%20Research%20priorities%20for%20a%20sustainable%20livestock%20sector%20in%20Europe.pdf> [Accessed 12/02/2019].
- BALLOU, M. A., HANSON, D. L., COBB, C. J., OBEIDAT, B. S., SELLERS, M. D., PEPPER-YOWELL, A. R., CARROLL, J. A., EARLEYWINE, T. J. & LAWHON, S. D. 2015.

- Plane of nutrition influences the performance, innate leukocyte responses, and resistance to an oral *Salmonella enterica* serotype Typhimurium challenge in Jersey calves. *Journal of Dairy Science*, 98, 1972-1982.
- BARGALLÓ, A. 2016. *Alteraciones en el funcionalismo de los macrófagos del sistema GALT (Gut-associated lymphoid tissue). Relación con la translocación bacteriana y el desarrollo de peritonitis bacteriana espontánea sobre un modelo de cirrosis experimental*. Tesis doctoral, Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona.
- BARKER, D. J. 2007. The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine*, 261, 412-417.
- BARTOL, F. F., WILEY, A. A., MILLER, D. J., SILVA, A. J., ROBERTS, K. E., DAVOLT, M. L., 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.
- 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.
- BAUMAN, D. E. & GRIINARI, J. M. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition*, 23, 203-227.
- BENZIE, I. F. F. & STRAIN, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- BERRY, M. J., JAQUIERY, A. L., OLIVER, M. H., HARDING, J. E. & BLOOMFIELD, F. H. 2016. Neonatal milk supplementation in lambs has persistent effects on growth and metabolic function that differ by sex and gestational age. *The British Journal of Nutrition*, 116, 1912-1925.
- BERTONI, G. & TREVISI, E. 2013. Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy herds. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 29, 413-431.
- BETANCOURT, M., ORTIZ, R. & GONZALEZ, C. 1992. Proliferation index in bone marrow cells from severely malnourished rats during lactation. *Mutation Research*, 283, 173-177.
- BIOLATTI, B., BOLLO, E., CANNIZZO, F. T., ZANCANARO, G., TARANTOLA, M., DACASTO, M., CANTIELLO, M., CARLETTI, M., BIOLATTI, P. G. & BARBARINO, G. 2005. Effects of low-dose dexamethasone on thymus morphology and immunological parameters in veal calves. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 52, 202-208.
- BIRBEN, E., SAHINER, U. M., SACKESSEN, C., ERZURUM, S. & KALAYCI, O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5, 9-19.
- BLANCO, C. 2017. *Desarrollo de nuevos sistemas de alimentación y estrategias productivas para la producción de carne de ovino*. Tesis doctoral, Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-Universidad de León.
- BLASCHITZ, C. & RAFFATELLU, M. 2010. Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. *Journal of Clinical Immunology*, 30, 196-203.
- CAL-PEREYRA, L., BENECH, A., GONZÁLEZ-MONTAÑA, J. R., ACOSTA-DIBARRAT, J., DA SILVA, S. & MARTÍN, A. 2015. Changes in the metabolic profile of pregnant ewes to an acute feed restriction in late gestation. *New Zealand Veterinary Journal*, 63, 141-146.

- CALDEIRA, R. M., BELO, A. T., SANTOS, C. C., VAZQUES, M. I. & PORTUGAL, A. V. 2007. The effect of long-term feed restriction and over-nutrition on body condition score, blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Ruminant Research*, 68, 242-255.
- CAMPBELL, D. I., MURCH, S. H., ELIA, M., SULLIVAN, P. B., SANYANG, M. S., JOBARTEH, B. & LUNN, P. G. 2003. Chronic T cell-mediated enteropathy in rural west African children: Relationship with nutritional status and small bowel function. *Pediatric Research*, 54, 306-311.
- 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-s335.
- CARBERRY, C. A., KENNY, D. A., SUKKYAN, H., 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, 4949-4958.
- CARROLL, J. A. & FORSBERG, N. E. 2007. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. *The Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice*, 23, 105-149.
- CELI, P. 2011. Oxidative Stress in Ruminants. In: MANDELKER, L. & VAJDOVICH, P. (eds.) *Studies on Veterinary Medicine*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 191-231.
- CERUTTI, A. & RESCIGNO, M. 2008. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity*, 28, 740-750.
- CHADIO, S., KATSAFADOU, A., KOTSAMPASI, B., MICHAILIDIS, G., MOUNTZOURIS, K. C., KALOGIANNIS, D. & CHRISTODOULOU, V. 2016. Effects of maternal undernutrition during late gestation and/or lactation on colostrum synthesis and immunological parameters in the offspring. *Reproduction, Fertility, and Development*, 28, 384-393.
- CHANDRA, R. K. 1983. Mucosal immune responses in malnutrition. *Annals of the New York Academy of Sciences* 409, 345-352.
- CHANDRA, R. K. 2004. Nutrición y sistema inmune desde la infancia hasta la edad avanzada. In: MARCOS, A. (ed.) *Actualización en Nutrición, Inmunidad e Infección*. Madrid: Panamericana, 1-9.
- CHEN, Y., OBA, M. & GUAN, L. L. 2012. Variation of bacterial communities and expression of Toll-like receptor genes in the rumen of steers differing in susceptibility to subacute ruminal acidosis. *Veterinary Microbiology*, 159, 451-459.
- CHEN, Y., PENNER, G. B., LI, M., OBA, M. & GUAN, L. L. 2011. Changes in bacterial diversity associated with epithelial tissue in the beef cow rumen during the transition to a high-grain diet. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 5770-5781.
- CHENG, K. J., MCCOWAN, R. P. & COSTERTON, J. W. 1979. Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 32, 139-148.
- CHEVALIER, P., SEVILLA, R., SEJAS, E., ZALLES, L., BELMONTE, G. & PARENT, G. 1998. Immune recovery of malnourished children takes longer than nutritional recovery: implications for treatment and discharge. *Journal of Tropical Pediatrics*, 44, 304-307.
- CHEW, B. P. & PARK, J. S. 2004. Carotenoid action on the immune response. *The Journal of Nutrition*, 134, 257s-261s.

- 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.
- CHOWDHURY, S. R., KING, D. E., WILLING, B. P., BAND, M. R., BEEVER, J. E., LANE, A. B., LOOR, J. J., MARINI, J. C., RUND, L. A., SCHOOK, L. B., VAN KESSEL, A. G. & GASKINS, H. R. 2007. Transcriptome profiling of the small intestinal epithelium in germfree versus conventional piglets. *BMC Genomics*, 8, 215.
- CLARKE, J., BINNIE, D., DOBBIE, J., JONES, K., MOWAT, C., PURCHAS, R. & ULJEE, A. 1996. Repeatabilities of blood plasma metabolites and their associations with leanness in genotypes showing a wide divergence in carcass composition. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 56, 180-183.
- COLLADO, M. C. & SANZ, Y. 2007. Quantification of mucosa-adhered microbiota of lambs and calves by the use of culture methods and fluorescent in situ hybridization coupled with flow cytometry techniques. *Veterinary Microbiology*, 121, 299-306.
- COON, R. E., DUFFIELD, T. F. & DEVRIES, T. J. 2019. Short communication: Risk of subacute ruminal acidosis affects the feed sorting behavior and milk production of early lactation cows. *Journal of Dairy Science*, 102, 652-659.
- DA COSTA, T. B., GOMES DE MORAIS, N., DE LIRA, J. M. B., DE ALMEIDA, T. M., GOCALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. D., PEREIRA, V. R. A., CAVALCANTI, M. D. & DE CASTRO, C. 2017. Relation between neonatal malnutrition and gene expression: inflammasome function in infections caused by *Candida Albicans*. *European Journal of Nutrition*, 56, 693-704.
- DAVIS, W. C., BROWN, W. C., HAMILTON, M. J., WYATT, C. R., ORDEN, J. A., KHALID, A. M. & NAESENS, J. 1996. Analysis of monoclonal antibodies specific for the gamma delta TcR. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 52, 275-283.
- DE BLASIO, M. J., BLACHE, D., GATFORD, K. L., ROBINSON, J. S. & OWENS, J. A. 2010. Placental restriction increases adipose leptin gene expression and plasma leptin and alters their relationship to feeding activity in the young lamb. *Pediatric Research*, 67, 603-608.
- DE BLASIO, M. J., GATFORD, K. L., MCMILLEN, I. C., ROBINSON, J. S. & OWENS, J. A. 2007. Placental restriction of fetal growth increases insulin action, growth, and adiposity in the young lamb. *Endocrinology*, 148, 1350-1358.
- DE MORAIS, N. G., DA COSTA, T. B., BEZERRA DE LIRA, J. M., GONCALVES DE ALBUQUERQUE, S. D. C., ALVES PEREIRA, V. R., CAVALCANTI, M. D. P. & MACHADO BARBOSA DE CASTRO, C. M. 2017. TLR and NLRP3 inflammasome expression deregulation in macrophages of adult rats subjected to neonatal malnutrition and infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nutrition*, 33, 174-180.
- DE PAULA, E. F. E. D., SOUZA, D. F. D., MONTEIRO, A. L. G., SANTANA, M. H. D. A., GILAVERTE, S., ROSSI JUNIOR, P. & LOCATELLI DITTRICH, R. 2013. Residual feed intake and hematological and metabolic blood profiles of Ile de France lambs. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42, 806-812.
- DE PAULA VIEIRA, A., VON KEYSERLINGK, M. A. & WEARY, D. M. 2012. Presence of an older weaned companion influences feeding behavior and improves performance of dairy calves before and after weaning from milk. *Journal of Dairy Science*, 95, 3218-3224.
- DELLSCHAFT, N. S., ALEXANDRE-GOUABAU, M. C., GARDNER, D. S., ANTIGNAC, J. P., KEISLER, D. H., BUDGE, H., SYMONDS, M. E. & SEBERT, S. P. 2015. Effect of pre- and postnatal growth and post-weaning activity on glucose metabolism in the offspring. *The Journal of Endocrinology*, 224, 171-182.

- DHABHAR, F. S. 2014. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunologic Research*, 58, 193-210.
- DONG, F., FORD, S. P., FANG, C. X., NIJLAND, M. J., NATHANIELSZ, P. W. & REN, J. 2005. Maternal nutrient restriction during early to mid gestation up-regulates cardiac insulin-like growth factor (IGF) receptors associated with enlarged ventricular size in fetal sheep. *Growth hormone & IGF research: official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*, 15, 291-299.
- DOS SANTOS-JUNIOR, E. F., GONCALVES-PIMENTEL, C., DE ARAUJO, L. C. C., DA SILVA, T. G., DE MELO-JUNIOR, M. R., MOURA-NETO, V. & ANDRADE-DA-COSTA, B. L. D. S. 2016. Malnutrition increases NO production and induces changes in inflammatory and oxidative status in the distal colon of lactating rats. *Neurogastroenterology and Motility*, 28, 1204-1216.
- DRÖGE, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82, 47-95.
- ECE, A., GURKAN, F., CELIK, F., BOSNAK, M., YEL, S., BALIK, H. & EREL, O. 2007. Paraoxonase, total antioxidant activity and peroxide levels in marasmic children: Relationships with leptin. *Clinical Biochemistry*, 40, 634-639.
- EL KAOUTARI, A., ARMOUGOM, F., GORDON, J. I., RAOULT, D. & HENRISSAT, B. 2013. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nature Reviews. Microbiology*, 11, 497-504.
- ELLISON, M. J., CONANT, G. C., LAMBERSON, W. R., COCKRUM, R. R., AUSTIN, K. J., RULE, D. C. & CAMMACK, K. M. 2017. Diet and feed efficiency status affect rumen microbial profiles of sheep. *Small Ruminant Research*, 156, 12-19.
- FERNANDO, S. C., PURVIS, H. T., NAJAR, F. Z., SUKHARNIKOV, L. O., KREHBIEL, C. R., NAGARAJA, T. G., ROE, B. A. & DESILVA, U. 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 7482-7490.
- FETOUI, H., GAROUI, M. & ZEGHAL, N. 2009. Protein restriction in pregnant- and lactating rats-induced oxidative stress and hypohomocysteinaemia in their offspring. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 93, 263-270.
- FISKE, R. A. & ADAMS, L. G. 1985. Immune responsiveness and lymphoreticular morphology in cattle fed hypo- and hyperalimentary diets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 8, 225-244.
- FITZSIMONS, C., KENNY, D. A., DEIGHTON, M. H., FAHEY, A. G. & MCGEE, M. 2013. Methane emissions, body composition, and rumen fermentation traits of beef heifers differing in residual feed intake. *Journal of Animal Science*, 91, 5789-5800.
- FITZSIMONS, C., MCGEE, M., KEOGH, K., WATERS, S. & KENNY, D. 2017. Molecular physiology of feed efficiency in beef cattle. In: SCANES, C. G. & HILL, R. A. (eds.) *Biology of Domestic Animals*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 120-163.
- FLÓ, J., ELÍAS, F., BENEDETTI, R. & MASSOUH, E. 1996. Reversible effects on B and T cells of the gut-associated lymphoid tissues in rats malnourished during suckling: impaired induction of the immune response to intra-Peyer patches immunization with cholera toxin. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 80, 147-154.
- FLÓ, J., ELÍAS, F., MASSOUH, E. & ROUX, M. E. 1994. Impairment of B and T cell maturation in gut associated lymphoid tissues due to malnutrition during lactation. *Developmental and Comparative Immunology*, 18, 543-555.
- FLÓ, J., MASSOUH, E. J. & ROUX, M. E. 1993. Long term effects of malnutrition during lactation on GALT. *Regional Immunology*, 5, 100-105.

- FOOTE, M. R., NONNECKE, B. J., BEITZ, D. C. & WATERS, W. R. 2007. High growth rate fails to enhance adaptive immune responses of neonatal calves and is associated with reduced lymphocyte viability. *Journal of Dairy Science*, 90, 404-417.
- FORD, S. P., HESS, B. W., SCHWOPE, M. M., NIJLAND, M. J., GILBERT, J. S., VONNAHME, K. A., MEANS, W. J., HAN, H. & NATHANIELSZ, P. W. 2007. Maternal undernutrition during early to mid-gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in male offspring. *Journal of Animal Science*, 85, 1285-1294.
- FRANCIS-EMMANUEL, P. M., THOMPSON, D. S., BARNETT, A. T., OSMOND, C., BYRNE, C. D., HANSON, M. A., GLUCKMAN, P. D., FORRESTER, T. E. & BOYNE, M. S. 2014. Glucose metabolism in adult survivors of severe acute malnutrition. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99, 2233-2240.
- FRIETEN, D., GERBERT, C., KOCH, C., DUSEL, G., EDER, K., KANITZ, E., WEITZEL, J. M. & HAMMON, H. M. 2017. *Ad libitum* milk replacer feeding, but not butyrate supplementation, affects growth performance as well as metabolic and endocrine traits in Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 100, 6648-6661.
- FRIGGENS, N. C., BLANC, F., BERRY, D. P. & PUILLET, L. 2017. Review: Deciphering animal robustness. A synthesis to facilitate its use in livestock breeding and management. *Animal*, 11, 2237-2251.
- GALAN, H. L., HUSSEY, M. J., CHUNG, M., CHYU, J. K., HOBBS, J. C. & BATTAGLIA, F. C. 1998. Doppler velocimetry of growth-restricted fetuses in an ovine model of placental insufficiency. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 178, 451-456.
- GAO, F., HOU, X. & LIU, Y. 2007. Effect of hormonal status and metabolic changes of restricted ewes during late pregnancy on their fetal growth and development. *Science in China. Series C, Life Sciences*, 50, 766-772.
- GAO, F., LIU, Y., ZHANG, C., ZHANG, Z. & SONG, S. 2013. Effect of intrauterine growth restriction during late pregnancy on the growth performance, blood components, immunity and anti-oxidation capability of ovine fetus. *Livestock Science*, 155, 435-441.
- GAO, F., LIU, Y. C., ZHANG, Z. H., ZHANG, C. Z., SU, H. W. & LI, S. L. 2012. Effect of prepartum maternal energy density on the growth performance, immunity, and antioxidation capability of neonatal calves. *Journal of Dairy Science*, 95, 4510-4518.
- GAO, X. & OBA, M. 2014. Relationship of severity of subacute ruminal acidosis to rumen fermentation, chewing activities, sorting behavior, and milk production in lactating dairy cows fed a high-grain diet. *Journal of Dairy Science*, 97, 3006-3016.
- GAO, X. & OBA, M. 2016. Characteristics of dairy cows with a greater or lower risk of subacute ruminal acidosis: Volatile fatty acid absorption, rumen digestion, and expression of genes in rumen epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, 99, 8733-8745.
- GARDNER, D. S., TINGEY, K., VAN BON, B. W. M., OZANNE, S. E., WILSON, V., DANDREA, J., KEISLER, D. H., STEPHENSON, T. & SYMONDS, M. E. 2005. Programming of glucose-insulin metabolism in adult sheep after maternal undernutrition. *American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 289, R947-R954.
- GEORGE, L. A., ZHANG, L., TUERSUNJIANG, N., MA, Y., LONG, N. M., UTHLAUT, A. B., SMITH, D. T., NATHANIELSZ, P. W. & FORD, S. P. 2012. Early maternal undernutrition programs increased feed intake, altered glucose metabolism and insulin secretion, and liver function in aged female offspring. *American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 302, R795-R804.

- GERBERT, C., FRIETEN, D., KOCH, C., DUSEL, G., EDER, K., STEFANIAK, T., BAJZERT, J., JAWOR, P., TUCHSCHERER, A. & HAMMON, H. M. 2018. Effects of *ad libitum* milk replacer feeding and butyrate supplementation on behavior, immune status, and health of Holstein calves in the postnatal period. *Journal of Dairy Science*, 101, 7348-7360.
- GIGER-REVERDIN, S., RIGALMA, K., DESNOYERS, M., SAUVANT, D. & DUVAUX-PONTER, C. 2014. Effect of concentrate level on feeding behavior and rumen and blood parameters in dairy goats: relationships between behavioral and physiological parameters and effect of between-animal variability. *Journal of Dairy Science*, 97, 4367-4378.
- GILBERT, J. S., LANG, A. L., GRANT, A. R. & NIJLAND, M. J. 2005. Maternal nutrient restriction in sheep: hypertension and decreased nephron number in offspring at 9 months of age. *The Journal of Physiology*, 565, 137-147.
- GLEESON, M. & CRIPPS, A. W. 2004. Development of mucosal immunity in the first year of life and relationship to sudden infant death syndrome. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 42, 21-33.
- GLUCKMAN, P. D., HANSON, M. A., COOPER, C. & THORNBURG, K. L. 2008. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *The New England Journal of Medicine*, 359, 61-73.
- GOLDBLUM, R. M., SCHANLER, R. J., GARZA, C. & GOLDMAN, A. S. 1989. Human milk feeding enhances the urinary excretion of immunologic factors in low birth weight infants. *Pediatric Research*, 25, 184-188.
- GÓMEZ, J. L., CAMPOS, C., RANGEL, P. & ORTIZ, R. 1996. Cell cycle phase duration in bone marrow cells from malnourished rats during suckling. *Mutation Research*, 352, 57-60.
- GONZÁLEZ-BARRANCO, J., RÍOS-TORRES, J. M., CASTILLO-MARTÍNEZ, L., LÓPEZ-ALVARENGA, J. C., AGUILAR-SALINAS, C. A., BOUCHARD, C., DEPRÈS, J. P. & TREMBLAY, A. 2003. Effect of malnutrition during the first year of life on adult plasma insulin and glucose tolerance. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 52, 1005-1011.
- GONZÁLEZ, L. A., MANTECA, X., CALSAMIGLIA, S., SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S. & FERRET, A. 2012. Ruminal acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). *Animal Feed Science and Technology*, 172, 66-79.
- GOOPY, J. P., DONALDSON, A., HEGARTY, R., VERCOE, P. E., HAYNES, F., BARNETT, M. & ODDY, V. H. 2014. Low-methane yield sheep have smaller rumens and shorter rumen retention time. *The British Journal of Nutrition*, 111, 578-585.
- GOPALAKRISHNAN, G. S., GARDNER, D. S., RHIND, S. M., RAE, M. T., KYLE, C. E., BROOKS, A. N., WALKER, R. M., RAMSAY, M. M., KEISLER, D. H., STEPHENSON, T. & SYMONDS, M. E. 2004. Programming of adult cardiovascular function after early maternal undernutrition in sheep. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287, R12-R20.
- GOZHO, G. N., KRAUSE, D. O. & PLAIZIER, J. C. 2007. Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90, 856-866.
- GOZHO, G. N., PLAIZIER, J. C., KRAUSE, D. O., KENNEDY, A. D. & WITTENBERG, K. M. 2005. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *Journal of Dairy Science*, 88, 1399-1403.

- GREEN, F. & HEYWORTH, B. 1980. Immunoglobulin-containing cells in jejunal mucosa of children with protein-energy malnutrition and gastroenteritis. *Archives of Disease in Childhood*, 55, 380-383.
- GREENWOOD, P. L., HUNT, A. S. & BELL, A. W. 2004. Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: IV. Organ growth. *Journal of Animal Science*, 82, 422-428.
- 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.
- GRIEBEL, P. J., SCHOONDERWOERD, M. & BABIUK, L. A. 1987. Ontogeny of the immune response: effect of protein energy malnutrition in neonatal calves. *Canadian Journal of Veterinary Research* 51, 428-435.
- GUARNER, F. & SCHAAFSMA, G. J. 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 237-238.
- GUZMAN, E., HOPE, J., TAYLOR, G., SMITH, A. L., CUBILLOS-ZAPATA, C. & CHARLESTON, B. 2014. Bovine gammadelta T cells are a major regulatory T cell subset. *Journal of Immunology* 193, 208-222.
- HALES, C. N. & BARKER, D. J. 2001. The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin*, 60, 5-20.
- HAMMON, H. M., FRIETEN, D., GERBERT, C., KOCH, C., DUSEL, G., WEIKARD, R. & KÜHN, C. 2018. Different milk diets have substantial effects on the jejunal mucosal immune system of pre-weaning calves, as demonstrated by whole transcriptome sequencing. *Scientific Reports*, 8, 1693.
- HAMMON, H. M., SCHIESSLER, G., NUSSBAUM, A. & BLUM, J. W. 2002. Feed intake patterns, growth performance, and metabolic and endocrine traits in calves fed unlimited amounts of colostrum and milk by automate, starting in the neonatal period. *Journal of Dairy Science*, 85, 3352-3362.
- HASPOLAT, K., ECE, A., GURKAN, F., ATAMER, Y., TUTANC, M. & YOLBAS, I. 2007. Relationships between leptin, insulin, IGF-1 and IGFBP-3 in children with energy malnutrition. *Clinical Biochemistry*, 40, 201-205.
- HAWKINS, P., STEYN, C., MCGARRIGLE, H. H., CALDER, N. A., SAITO, T., STRATFORD, L. L., NOAKES, D. E. & HANSONA, M. A. 2000. Cardiovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal axis development in late gestation fetal sheep and young lambs following modest maternal nutrient restriction in early gestation. *Reproduction, Fertility, and Development*, 12, 443-456.
- HE, Z. X., SUN, Z. H., TAN, Z. L., TANG, S. X., ZHOU, C. S., HAN, X. F., WANG, M., WU, D. Q., KANG, J. H. & BEAUCHEMIN, K. A. 2012. Effects of maternal protein or energy restriction during late gestation on antioxidant status of plasma and immune tissues in postnatal goats. *Journal of Animal Science*, 90, 4319-4326.
- HE, Z. X., SUN, Z. H., YANG, W. Z., BEAUCHEMIN, K. A., TANG, S. X., ZHOU, C. S., HAN, X. F., WANG, M., KANG, J. H. & TAN, Z. L. 2014. Effects of maternal protein or energy restriction during late gestation on immune status and responses to lipopolysaccharide challenge in postnatal young goats. *Journal of Animal Science*, 92, 4856-4864.

- HEGARTY, R. S., GOOPY, J. P., HERD, R. M. & MCCORKELL, B. 2007. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. *Journal of Animal Science*, 85, 1479-1486.
- HENDERSON, G., COX, F., GANESH, S., JONKER, A., YOUNG, W. & JANSSEN, P. H. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports*, 5, 14567.
- HERD, R. M. & ARTHUR, P. F. 2009. Physiological basis for residual feed intake. *Journal of Animal Science*, 87, E64-E71.
- HERD, R. M. & BISHOP, S. C. 2000. Genetic variation in residual feed intake and its association with other production traits in British Hereford cattle. *Livestock Production Science*, 63, 111-119.
- HERNÁNDEZ-CASTELLANO, L. E., MORENO-INDIAS, I., MORALES-DELANUEZ, A., SÁNCHEZ-MACÍAS, D., TORRES, A., CAPOTE, J., ARGÜELLO, A. & CASTRO, N. 2015a. The effect of milk source on body weight and immune status of lambs. *Livestock Science*, 175, 70-76.
- HERNÁNDEZ-CASTELLANO, L. E., SUÁREZ-TRUJILLO, A., MARTELL-JAIZME, D., CUGNO, G., ARGÜELLO, A. & CASTRO, N. 2015b. The effect of colostrum period management on BW and immune system in lambs: from birth to weaning. *Animal*, 9, 1672-1679.
- HERNÁNDEZ, J., BENEDITO, J. L., ABUELO, A. & CASTILLO, C. 2014. Ruminal acidosis in feedlot: from aetiology to prevention. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 702572.
- HOFFMAN, M. L., PECK, K. N., FORELLA, M. E., FOX, A. R., GOVONI, K. E. & ZINN, S. A. 2016. The effects of poor maternal nutrition during gestation on postnatal growth and development of lambs. *Journal of Animal Science*, 94, 789-799.
- HORNICK, J. L., VAN EENAEME, C., GERARD, O., DUFRASNE, I. & ISTASSE, L. 2000. Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domestic Animal Endocrinology*, 19, 121-132.
- HOSTETTLER-ALLEN, R. L., TAPPY, L. & BLUM, J. W. 1994. Insulin resistance, hyperglycemia, and glucosuria in intensively milk-fed calves. *Journal of Animal Science*, 72, 160-173.
- HU, L., LIU, Y., YAN, C., PENG, X., XU, Q., XUAN, Y., HAN, F., TIAN, G., FANG, Z., LIN, Y., XU, S., ZHANG, K., CHEN, D., WU, D. & CHE, L. 2015. Postnatal nutritional restriction affects growth and immune function of piglets with intra-uterine growth restriction. *British Journal of Nutrition*, 114, 53-62.
- HUGHES, E. J. 1999. Diet and the maturation of the immune system. *Food and Agricultural Immunology*, 11, 279-285.
- HUGI, D., BRUCKMAIER, R. M. & BLUM, J. W. 1997. Insulin resistance, hyperglycemia, glucosuria, and galactosuria in intensively milk-fed calves: dependency on age and effects of high lactose intake. *Journal of Animal Science*, 75, 469-482.
- HUMER, E., GHAREEB, K., HARDER, H., MICKDAM, E., KHOL-PARISINI, A. & ZEBELI, Q. 2015. Periparturient changes in reticuloruminal pH and temperature in dairy cows differing in the susceptibility to subacute rumen acidosis. *Journal of Animal Science*, 98, 8788-8799.
- ISOLAURI, E., SUTAS, Y., KANKAANPAA, P., ARVILOMMI, H. & SALMINEN, S. 2001. Probiotics: effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 444S-450S.
- JAMI, E., ISRAEL, A., KOTSER, A. & MIZRAHI, I. 2013. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The ISME Journal*, 7, 1069-1079.

- JANSEN, T. & DAIBER, A. 2012. Direct antioxidant properties of bilirubin and biliverdin. Is there a role for biliverdin reductase? *Frontiers in Pharmacology*, 3, 30.
- JAQUIERY, A. L., PARK, S. S., PHUA, H. H., BERRY, M. J., MEIJLER, D., HARDING, J. E., OLIVER, M. H. & BLOOMFIELD, F. H. 2016. Brief neonatal nutritional supplementation has sex-specific effects on glucose tolerance and insulin regulating genes in juvenile lambs. *Pediatric Research*, 80, 861-869.
- JIAO, J., HUANG, J., ZHOU, C. & TAN, Z. 2015. Taxonomic identification of ruminal epithelial bacterial diversity during rumen development in goats. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 3502-3509.
- KAISERLIAN, D. & ETCHART, N. 1999. Entry sites for oral vaccines and drugs: A role for M cells, enterocytes and dendritic cells? *Seminars in Immunology*, 11, 217-224.
- KAMIYA, M., MATSUZAKI, M., ORITO, H., KAMIYA, Y., NAKAMURA, Y. N. & TSUNEISHI, E. 2009. Effects of feeding level of milk replacer on body growth, plasma metabolite and insulin concentrations, and visceral organ growth of suckling calves. *Animal Science Journal* 80, 662-668.
- KARMIN, O., RODRIGUEZ-LECOMPTE, J. C., OMINSKI, K. H., LI, S., WOYENGO, T. W., KROEKER, Á. D. & PLAIZIER, J. C. 2011. Effect of grain- and alfalfa pellet-induced sub-acute rumen acidosis (SARA) challenges on oxidative stress in dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*, 91, 512-513.
- KASCHULA, R. O., GAJJAR, P. D., MANN, M., HILL, I., PURVIS, J., BLAKE, D. R. & BOWIE, M. D. 1979. Infantile jejunal mucosa in infection and malnutrition. *Israel Journal of Medical Sciences*, 15, 356-361.
- KELLY, D. & COUTTS, A. G. P. 2000. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. *Proceedings of the Nutrition Society*, 59, 177-185.
- 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.
- KESSER, J., KORST, M., KOCH, C., ROMBERG, F. J., REHAGE, J., MULLER, U., SCHMICKE, M., EDER, K., HAMMON, H. M., SADRI, H. & SAUERWEIN, H. 2017. Different milk feeding intensities during the first 4 weeks of rearing dairy calves: Part 2: Effects on the metabolic and endocrine status during calthood and around the first lactation. *Journal of Dairy Science*, 100, 3109-3125.
- KHAFIPOUR, E., LI, S., PLAIZIER, J. C. & KRAUSE, D. O. 2009. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 7115-7124.
- KHAN, M. A., LEE, H. J., LEE, W. S., KIM, H. S., KIM, S. B., KI, K. S., HA, J. K., LEE, H. G. & CHOI, Y. J. 2007. Pre- and postweaning performance of holstein female calves fed milk through step-down and conventional methods. *Journal of Dairy Science*, 90, 876-885.
- KHAN, M. A., WEARY, D. M. & VON KEYSERLINGK, M. A. 2011. Invited review: effects of milk ration on solid feed intake, weaning, and performance in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 94, 1071-1081.
- KHANAL, P., AXEL, A. M., KONGSTED, A. H., HUSTED, S. V., JOHNSEN, L., PANDEY, D., PEDERSEN, K. L., BIRTWISTLE, M., MARKUSSEN, B., KADARMIDEEN, H. N. & NIELSEN, M. O. 2015. Late gestation under- and overnutrition have differential impacts when combined with a post-natal obesogenic diet on glucose-lactate-insulin adaptations during metabolic challenges in adolescent sheep. *Acta Physiologica*, 213, 519-536.

- KHANAL, P., HUSTED, S. V., AXEL, A. M., JOHNSEN, L., PEDERSEN, K. L., MORTENSEN, M. S., KONGSTED, A. H. & NIELSEN, M. O. 2014. Late gestation over- and undernutrition predispose for visceral adiposity in response to a post-natal obesogenic diet, but with differential impacts on glucose-insulin adaptations during fasting in lambs. *Acta Physiologica*, 210, 110-126.
- KHANAL, P., JOHNSEN, L., AXEL, A. M. D., HANSEN, P. W., KONGSTED, A. H., LYCKEGAARD, N. B. & NIELSEN, M. O. 2016. Long-term impacts of foetal malnutrition followed by early postnatal obesity on fat distribution pattern and metabolic adaptability in adult sheep. *PLoS One*, 11, e0156700.
- KHIAOSA-ARD, R., POURAZAD, P., ADITYA, S., HUMER, E. & ZEBELI, Q. 2018. Factors related to variation in the susceptibility to subacute ruminal acidosis in early lactating Simmental cows fed the same grain-rich diet. *Animal Feed Science and Technology*, 238, 111-122.
- KLEEMANN, R. & KOOISTRA, T. 2005. HMG-CoA reductase inhibitors: effects on chronic subacute inflammation and onset of atherosclerosis induced by dietary cholesterol. *Current Drug Targets. Cardiovascular & Haematological Disorders*, 5, 441-453.
- KLEVENHUSEN, F., POURAZAD, P., WETZELS, S. U., QUMAR, M., KHOL-PARISINI, A. & ZEBELI, Q. 2014. Technical note: Evaluation of a real-time wireless pH measurement system relative to intraruminal differences of digesta in dairy cattle. *Journal of Animal Science*, 92, 5635-5639.
- KLOBASA, F. & WERHAHN, E. 1989. Variations in the concentrations of the immunoglobulins IgG1, IgG2, IgM and IgA in sheep. 2. Changes in the blood of lambs of different breeds and crossbreeds during the course of the rearing period. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, 102, 331-337.
- KNAP, P. 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.
- KNOTT, S. A., CUMMINS, L. J., DUNSHEA, F. R. & LEURY, B. J. 2010. Feed efficiency and body composition are related to cortisol response to adrenocorticotropin hormone and insulin-induced hypoglycemia in rams. *Domestic Animal Endocrinology*, 39, 137-146.
- 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.
- KONGSTED, A. H., TYGESEN, M. P., HUSTED, S. V., OLIVER, M. H., TOLVER, A., CHRISTENSEN, V. G., NIELSEN, J. H. & NIELSEN, M. O. 2014. Programming of glucose-insulin homeostasis: long-term consequences of pre-natal versus early post-natal nutrition insults. Evidence from a sheep model. *Acta Physiologica*, 210, 84-98.
- KORST, M., KOCH, C., KESSER, J., MULLER, U., ROMBERG, F. J., REHAGE, J., EDER, K. & SAUERWEIN, H. 2017. Different milk feeding intensities during the first 4 weeks of rearing in dairy calves: Part 1: Effects on performance and production from birth over the first lactation. *Journal of Dairy Science*, 100, 3096-3108.
- KRÖGER, I., HUMER, E., NEUBAUER, V., REISINGER, N., ADITYA, S. & ZEBELI, Q. 2017. Modulation of chewing behavior and reticular pH in nonlactating cows challenged with concentrate-rich diets supplemented with phytogenic compounds and autolyzed yeast. *Journal of Dairy Science*, 100, 9702-9714.
- LAN, X., CRETNEY, E. C., KROPP, J., KHATEEB, K., BERG, M. A., PENAGARICANO, F., MAGNESS, R., RADUNZ, A. E. & KHATIB, H. 2013. Maternal diet during pregnancy

- induces gene expression and DNA methylation changes in fetal tissues in sheep. *Frontiers in Genetics*, 4, 49.
- LARA-PADILLA, E., CAMPOS-RODRÍGUEZ, R., JARILLO-LUNA, A., REYNA-GARFIAS, H., RIVERA-AGUILAR, V., MILIAR, A., BERRAL DE LA ROSA, F. J., NAVAS, P. & LÓPEZ-LLUCH, G. 2011. Caloric restriction reduces IgA levels and modifies cytokine mRNA expression in mouse small intestine. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22, 560-566.
- LAWRENCE, P., KENNY, D. A., EARLEY, B. & MCGEE, M. 2012. Grazed grass herbage intake and performance of beef heifers with predetermined phenotypic residual feed intake classification. *Animal*, 6, 1648-1661.
- LÉRIAS, J. R., PENA, R., HERNÁNDEZ-CASTELLANO, L. E., CAPOTE, J., CASTRO, N., ARGÜELLO, A., ARAÚJO, S. S., SACO, Y., BASSOLS, A. & ALMEIDA, A. M. 2015. Establishment of the biochemical and endocrine blood profiles in the Majorera and Palmera dairy goat breeds: the effect of feed restriction. *The Journal of Dairy Research*, 82, 416-425.
- LEY, R. E., TURNBAUGH, P. J., KLEIN, S. & GORDON, J. I. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444, 1022-1023.
- LI, F., WANG, Z., DONG, C., LI, F., WANG, W., YUAN, Z., MO, F. & WENG, X. 2017. Rumen bacteria communities and performances of fattening lambs with a lower or greater subacute ruminal acidosis risk. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2506.
- LI, R. W., CONNOR, E. E., LI, C., BALDWIN, R. L. & SPARKS, M. E. 2012. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environmental Microbiology*, 14, 129-139.
- LIANG, Y. S., LI, G. Z., LI, X. Y., LU, J. Y., LI, F. D., TANG, D. F., LI, F., DENG, Y., ZHANG, H., WANG, Z. L. & WENG, X. X. 2017. Growth performance, rumen fermentation, bacteria composition, and gene expressions involved in intracellular pH regulation of rumen epithelium in finishing Hu lambs differing in residual feed intake phenotype. *Journal of Animal Science*, 95, 1727-1738.
- LIE, K. I., ALEKSANDERSEN, M. & LANDSVERK, T. 2005. Lymphoid follicles of different phenotype appear in ileum during involution of the sheep ileal Peyer's patch. *Developmental and Comparative Immunology*, 29, 539-553.
- LIU, J., BIAN, G., SUN, D., ZHU, W. & MAO, S. 2017. Starter feeding altered ruminal epithelial bacterial communities and some key immune-related genes' expression before weaning in lambs. *Journal of Animal Science*, 95, 910-921.
- LIU, J. H., BIAN, G. R., ZHU, W. Y. & MAO, S. Y. 2015a. High-grain feeding causes strong shifts in ruminal epithelial bacterial community and expression of Toll-like receptor genes in goats. *Frontiers in Microbiology*, 6, 167.
- LIU, Y., HE, S., ZHANG, Y., XIA, W., LI, M., ZHANG, C. & GAO, F. 2015b. Effects of intrauterine growth restriction during late pregnancy on the development of the ovine fetal thymus and the T-lymphocyte subpopulation. *American Journal of Reproductive Immunology* 74, 26-37.
- LIZARRAGA-MOLLINEDO, E., FERNÁNDEZ-MILLÁN, E., GARCÍA-SAN FRUTOS, M., DE TORO-MARTÍN, J., FERNÁNDEZ-AGULLÓ, T., ROS, M., ÁLVAREZ, C. & ESCRIVÁ, F. 2015. Early and long-term undernutrition in female rats exacerbates the metabolic risk associated with nutritional rehabilitation. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 19353-19366.

- MABBOTT, N. A., DONALDSON, D. S., OHNO, H., WILLIAMS, I. R. & MAHAJAN, A. 2013. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunology*, 6, 666-677.
- MACCARI, P., WIEDEMANN, S., KUNZ, H. J., PIECHOTTA, M., SANFTLEBEN, P. & KASKE, M. 2015. Effects of two different rearing protocols for Holstein bull calves in the first 3 weeks of life on health status, metabolism and subsequent performance. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99, 737-746.
- MACKNESS, B., DAVIES, G. K., TURKIE, W., LEE, E., ROBERTS, D. H., HILL, E., ROBERTS, C., DURRINGTON, P. N. & MACKNESS, M. I. 2001. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21, 1451-1457.
- MALMUTHUGE, N., GRIEBEL, P. J. & GUAN LE, L. 2014. Taxonomic identification of commensal bacteria associated with the mucosa and digesta throughout the gastrointestinal tracts of preweaned calves. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 2021-2028.
- MALMUTHUGE, N., LI, M., FRIES, P., GRIEBEL, P. J. & GUAN, L. L. 2012. Regional and age dependent changes in gene expression of Toll-like receptors and key antimicrobial defence molecules throughout the gastrointestinal tract of dairy calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 146, 18-26.
- MANHART, N., VIERLINGER, K., BERGMEISTER, H., BOLTZ-NITULESCU, G., SPITTLER, A. & ROTH, E. 2000. Influence of short-term protein malnutrition of mice on the phenotype and costimulatory signals of lymphocytes from spleen and Peyer's patches. *Nutrition*, 16, 197-201.
- MAO, S., ZHANG, M., LIU, J. & ZHU, W. 2015. Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function. *Scientific Reports*, 5, 16116.
- MAO, S. Y., ZHANG, R. Y., WANG, D. S. & ZHU, W. Y. 2013. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing. *Anaerobe*, 24, 12-19.
- MÁRQUEZ, M. G., GALEANO, A., OLMOS, S. & ROUX, M. E. 2000. Flow cytometric analysis of intestinal intraepithelial lymphocytes in a model of immunodeficiency in Wistar rats. *Cytometry*, 41, 115-122.
- MARTÍNEZ DE MORENTÍN, B. E., RODRÍGUEZ, M. C. & MARTÍNEZ, J. A. 2003. Síndrome metabólico, resistencia a la insulina y metabolismo tisular. *Endocrinología y Nutrición*, 50, 324-333.
- MCCANN, J. C., LUAN, S., CARDOSO, F. C., DERAKHSHANI, H., KHAFIPOUR, E. & LOOR, J. J. 2016. Induction of subacute ruminal acidosis affects the ruminal microbiome and epithelium. *Frontiers in Microbiology*, 7, 701.
- MCCANN, J. C., WILEY, L. M., FORBES, T. D., ROUQUETTE, F. M., JR. & TEDESCHI, L. O. 2014. Relationship between the rumen microbiome and residual feed intake-efficiency of Brahman bulls stocked on bermudagrass pastures. *PLoS One*, 9, e91864.
- MCCOARD, S. A., SALES, F. A. & SCIASCIA, Q. L. 2017. Invited review: impact of specific nutrient interventions during mid-to-late gestation on physiological traits important for survival of multiple-born lambs. *Animal*, 11, 1727-1736.
- MCCOWAN, R. P., CHENG, K. J. & COSTERTON, J. W. 1980. Adherent bacterial populations on the bovine rumen wall: distribution patterns of adherent bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 233-241.

- MEYDANI, S. N., WU, D., SANTOS, M. S. & HAYEK, M. G. 1995. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1462s-1476s.
- MEYER, A., CATON, J., HESS, B., FORD, S. & REYNOLDS, L. 2012. Epigenetics and effects on the neonate that may impact feed efficiency. *In: HILL, R. A. (ed.) Feed Efficiency in the Beef Industry*. Ames, Iowa: John Willey & Sons. Inc., 199-223.
- MINUTI, A., AHMED, S., TREVISI, E., PICCIOLI-CAPPELLI, F., BERTONI, G., JAHAN, N. & BANI, P. 2014. Experimental acute rumen acidosis in sheep: Consequences on clinical, rumen, and gastrointestinal permeability conditions and blood chemistry. *Journal of Animal Science*, 92, 3966-3977.
- MITCHELL, A. & SCHOLZ, A. 2008. Efficiency of energy and protein deposition in swine measured by dual energy X-ray absorptiometry (DXA). *Archiv für Tierzucht*, 51, 160-172.
- MOALLEM, U., WERNER, D., LEHRER, H., ZACHUT, M., LIVSHITZ, L., YAKOBY, S. & SHAMAY, A. 2010. Long-term effects of *ad libitum* whole milk prior to weaning and prepubertal protein supplementation on skeletal growth rate and first-lactation milk production. *Journal of Dairy Science*, 93, 2639-2650.
- MONK, J. M., STEEVELS, T. A., HILLYER, L. M. & WOODWARD, B. 2011. Constitutive, but not challenge-induced, interleukin-10 production is robust in acute pre-pubescent protein and energy deficits: new support for the tolerance hypothesis of malnutrition-associated immune depression based on cytokine production in vivo. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8, 117-135.
- 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.
- MORAN, L. K., GUTTERIDGE, J. M. C. & QUINLAN, G. J. 2001. Thiols in cellular redox signalling and control. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 763-772.
- MOWAT, A. M. & AGACE, W. W. 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14, 667-685.
- MUELLER, R. E., ASPLUND, J. M. & IANNOTTI, E. L. 1984. Successive changes in the epimural bacterial community of young lambs as revealed by scanning electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 715-723.
- MUNCH, E. M., HARRIS, R. A., MOHAMMAD, M., BENHAM, A. L., PEJERREY, S. M., SHOWALTER, L., HU, M., SHOPE, C. D., MANINGAT, P. D., GUNARATNE, P. H., HAYMOND, M. & AAGAARD, K. 2013. Transcriptome profiling of microRNA by Next-Gen deep sequencing reveals known and novel miRNA species in the lipid fraction of human breast milk. *PLoS One*, 8, e50564.
- MYER, P. R., SMITH, T. P., WELLS, J. E., KUEHN, L. A. & FREETLY, H. C. 2015a. Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. *PLoS One*, 10, e0129174.
- MYER, P. R., WELLS, J. E., SMITH, T. P. L., KUEHN, L. A. & FREETLY, H. C. 2015b. Microbial community profiles of the colon from steers differing in feed efficiency. *Springerplus*, 4, 454.
- NAGARAJA, T. G. & TITGEMEYER, E. C. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. *Journal of Dairy Science*, 90, E17-E38.
- NASROLLAHI, S. M., ZALI, A., GHORBANI, G. R., MORADI SHAHRBABA, M. & HEYDARI SOLTAN ABADI, M. 2017. Variability in susceptibility to acidosis among high producing mid-lactation dairy cows is associated with rumen pH, fermentation, feed

- intake, sorting activity, and milk fat percentage. *Animal Feed Science and Technology*, 228, 72-82.
- NAYAK, B. N., FRIEL, J. K., REMPEL, C. B. & JONES, P. J. H. 2009. Energy-restricted diets result in higher numbers of CD4⁺, CD8⁺, immunoglobulins (A, M, and G), and CD45RA cells in spleen and CD4⁺, immunoglobulin A, and CD45RA cells in colonic lamina propria of rats. *Nutrition Research*, 29, 487-493.
- NICHOLSON, M. J., EVANS, P. N. & JOBLIN, K. N. 2007. Analysis of methanogen diversity in the rumen using temporal temperature gradient gel electrophoresis: identification of uncultured methanogens. *Microbial Ecology*, 54, 141-150.
- NIELSEN, M. O., KONGSTED, A. H., THYGESEN, M. P., STRATHE, A. B., CADDY, S., QUISTORFF, B., JORGENSEN, W., CHRISTENSEN, V. G., HUSTED, S., CHWALIBOG, A., SEJRSEN, K., PURUP, S., SVALASTOGA, E., MCEVOY, F. J. & JOHNSEN, L. 2013. Late gestation undernutrition can predispose for visceral adiposity by altering fat distribution patterns and increasing the preference for a high-fat diet in early postnatal life. *The British Journal of Nutrition*, 109, 2098-2110.
- NOCEK, J. E. 1997. Bovine acidosis: implications on laminitis. *Journal of Dairy Science*, 80, 1005-1028.
- NONNECKE, B. J., FOOTE, M. R., SMITH, J. M., PESCH, B. A. & VAN AMBURGH, M. E. 2003. Composition and functional capacity of blood mononuclear leukocyte populations from neonatal calves on standard and intensified milk replacer diets. *Journal of Dairy Science*, 86, 3592-3604.
- NOVA, E., MONTERO, A., GÓMEZ, S. & MARCOS, A. 2004. La estrecha relación entre la nutrición y el sistema inmunitario. In: GÓMEZ CANDELA, C. & SASTRE GALLEGO, A. (eds.) *Soporte Nutricional en el Paciente Oncológico*. Barcelona: Glosa, 9-21.
- OBEIDAT, B. S., COBB, C. J., SELLERS, M. D., PEPPER-YOWELL, A. R., EARLEYWINE, T. J. & BALLOU, M. A. 2013. Plane of nutrition during the preweaning period but not the grower phase influences the neutrophil activity of Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 96, 7155-7166.
- ODDE, K. G., KIRACOFÉ, G. H. & SCHALLES, R. R. 1985. Suckling behavior in range beef calves. *Journal of Animal Science*, 61, 307-309.
- OETZEL, G. R. Subacute ruminal acidosis in dairy herds: physiology, pathophysiology, milk fat responses, and nutritional management. In: Preconference seminar 7A: *Dairy herd problem investigation strategies: lameness, cow comfort, and ruminal Acidosis*. 40th Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners. Vancouver, BC, Canada, pp. 89-119.
- OETZEL, G. R. 2017. Diagnosis and management of subacute ruminal acidosis in dairy herds. *The Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice*, 33, 463-480.
- OLIVER, M. H., HAWKINS, P., BREIER, B. H., VAN ZIJL, P. L., SARGISON, S. A. & HARDING, J. E. 2001. Maternal undernutrition during the periconceptual period increases plasma taurine levels and insulin response to glucose but not arginine in the late gestational fetal sheep. *Endocrinology*, 142, 4576-4579.
- OLLIVETT, T. L., NYDAM, D. V., LINDEN, T. C., BOWMAN, D. D. & VAN AMBURGH, M. E. 2012. Effect of nutritional plane on health and performance in dairy calves after experimental infection with *Cryptosporidium parvum*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241, 1514-1520.
- OLSEN, L. 2015. *Investigation of the gut-associated Lymphoid tissue in sheep with emphasis on natural killer cells*. PhD Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Norwegian University of Life Sciences.

- OWENS, F. N., SECRIST, D. S., HILL, W. J. & GILL, D. R. 1998. Acidosis in cattle: a review. *Journal of Animal Science*, 76, 275-286.
- OWENS, J. A., THAVANESWARAN, P., DE BLASIO, M. J., MCMILLEN, I. C., ROBINSON, J. S. & GATFORD, K. L. 2007. Sex-specific effects of placental restriction on components of the metabolic syndrome in young adult sheep. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 292, E1879-E1889.
- PACAK, K. & PALKOVITS, M. 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine Reviews*, 22, 502-548.
- PALMER, A. C. 2011. Nutritionally mediated programming of the developing immune system. *Advances in Nutrition*, 2, 377-395.
- PAUL, S. & DEY, A. 2015. Nutrition in health and immune function of ruminants. *Indian Journal of Animal Sciences*, 85, 103-112.
- PENNER, G. B., ASCHENBACH, J. R., GABEL, G., RACKWITZ, R. & OBA, M. 2009a. Epithelial capacity for apical uptake of short chain fatty acids is a key determinant for intraruminal pH and the susceptibility to subacute ruminal acidosis in sheep. *The Journal of Nutrition*, 139, 1714-1720.
- PENNER, G. B., TANIGUCHI, M., GUAN, L. L., BEAUCHEMIN, K. A. & OBA, M. 2009b. Effect of dietary forage to concentrate ratio on volatile fatty acid absorption and the expression of genes related to volatile fatty acid absorption and metabolism in ruminal tissue. *Journal of Dairy Science*, 92, 2767-2781.
- PEREA, K., PERZ, K., OLIVO, S. K., WILLIAMS, A., LACHMAN, M., ISHAQ, S. L., THOMSON, J. & YEOMAN, C. J. 2017. Feed efficiency phenotypes in lambs involve changes in ruminal, colonic, and small-intestine-located microbiota. *Journal of Animal Science*, 95, 2585-2592.
- PETER, R. F., GUGUSHEFF, J., WOOLDRIDGE, A. L., GATFORD, K. L. & MUHLHAUSLER, B. S. 2017. Placental restriction in multi-fetal pregnancies and between-twin differences in size at birth alter neonatal feeding behaviour in the sheep. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 8, 357-369.
- PETERSEN, H. H., NIELSEN, J. P. & HEEGAARD, P. M. 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, 35, 163-187.
- PETRI, R. M., POURAZAD, P., KHIAOSA-ARD, R., KLEVENHUSEN, F., METZLER-ZEBELI, B. U. & ZEBELI, Q. 2017. Temporal dynamics of in-situ fiber-adherent bacterial community under ruminal acidotic conditions determined by 16S rRNA gene profiling. *PLoS One*, 12, e0182271.
- PETRI, R. M., SCHWAIGER, T., PENNER, G. B., BEAUCHEMIN, K. A., FORSTER, R. J., MCKINNON, J. J. & MCALLISTER, T. A. 2013. Changes in the rumen epimural bacterial diversity of beef cattle as affected by diet and induced ruminal acidosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 3744-3755.
- PICCININI, A. M. & MIDWOOD, K. S. 2010. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators of Inflammation*, 2010, 672395.
- PLAIZIER, J. C., DANESH MESGARAN, M., DERAKHSHANI, H., GOLDER, H., KHAFIPOUR, E., KLEEN, J. L., LEAN, I., LOOR, J., PENNER, G. & ZEBELI, Q. 2018. Review: Enhancing gastrointestinal health in dairy cows. *Animal*, 12, s399-s418.
- PLAIZIER, J. C., KRAUSE, D. O., GOZHO, G. N. & MCBRIDE, B. W. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *Veterinary Journal*, 176, 21-31.

- PLAIZIER, J. C., LI, S., DANSCHER, A. M., DERAKSHANI, H., ANDERSEN, P. H. & KHAFAIPOUR, E. 2017. Changes in microbiota in rumen digesta and feces due to a grain-based subacute ruminal acidosis (SARA) challenge. *Microbial Ecology*, 74, 485-495.
- POLLOCK, J. M., ROWAN, T. G., DIXON, J. B. & CARTER, S. D. 1994. Level of nutrition and age at weaning: effects on humoral immunity in young calves. *The British Journal of Nutrition*, 71, 239-248.
- POORE, K. R., CLEAL, J. K., NEWMAN, J. P., BOULLIN, J. P., NOAKES, D. E., HANSON, M. A. & GREEN, L. R. 2007. Nutritional challenges during development induce sex-specific changes in glucose homeostasis in the adult sheep. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 292, E32-E39.
- POORE, K. R., HOLLIS, L. J., MURRAY, R. J. S., WARLOW, A., BREWIN, A., FULFORD, L., CLEAL, J. K., LILLYCROP, K. A., BURDGE, G. C., HANSON, M. A. & GREEN, L. R. 2014. Differential pathways to adult metabolic dysfunction following poor nutrition at two critical developmental periods in sheep. *PLoS One*, 9, e90994.
- PREDONZANI, A., CALI, B., AGNELLINI, A. H. & MOLON, B. 2015. Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: When inflammation says nitric oxide. *World Journal of Experimental Medicine*, 5, 64-76.
- PREIDIS, G. A., AJAMI, N. J., WONG, M. C., BESSARD, B. C., CONNER, M. E. & PETROSINO, J. F. 2015. Composition and function of the undernourished neonatal mouse intestinal microbiome. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26, 1050-1057.
- PROKOP, L., KASKE, M., MACCARI, P., LUCIUS, R., KUNZ, H. J. & WIEDEMANN, S. 2015. Intensive rearing of male calves during the first three weeks of life has long-term effects on number of islets of Langerhans and insulin stained area in the pancreas. *Journal of Animal Science*, 93, 988-998.
- PULINA, G., NUDDA, A., BATTACONE, G., DIMAURO, C., MAZZETTE, A., BOMBOI, G. & FLORIS, B. 2012. Effects of short-term feed restriction on milk yield and composition, and hormone and metabolite profiles in mid-lactation Sarda dairy sheep with different body condition score *Italian Journal of Animal Science*, 11, e28.
- QUIGLEY, J. D., WOLFE, T. A. & ELSASSER, T. H. 2006. Effects of additional milk replacer feeding on calf health, growth, and selected blood metabolites in calves. *Journal of Dairy Science*, 89, 207-216.
- RAINARD, P. & RIOLLET, C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research*, 37, 369-400.
- RAUW, W. M. 2012. Immune response from a resource allocation perspective. *Frontiers in Genetics*, 3, 267.
- REYNOLDS, J. D. & MORRIS, B. 1983. The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *European Journal of Immunology*, 13, 627-635.
- RHO, S., KIM, H., SHIM, S. H., LEE, S. Y., KIM, M. J., YANG, B.-G., JANG, M. H., HAIL, B. W., SONG, M. K., CZERKINSKY, C. & KIM, J.-O. 2017. Protein energy malnutrition alters mucosal IgA responses and reduces mucosal vaccine efficacy in mice. *Immunology Letters*, 190, 247-256.
- RICHARDSON, E. C., HERD, R. M., ARCHER, J. A. & ARTHUR, P. F. 2004. Metabolic differences in Angus steers divergently selected for residual feed intake *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44, 441-452.
- RIERA, C. M., MACCIONI, M. AND SOTOMAYOR, C. E. 2008. The role of the immune system. In: FULLER, R. & PERDIGÓN, G. (eds.) *Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health*. Chichester: Wiley-Blackwell, 99-136.

- RIEU, F., FONTY, G. & GOUET, P. 1989. Colony counts and characterization of bacteria adherent to the rumen wall and desquamated epithelial cells in conventional young lambs. *Canadian Journal of Microbiology*, 35, 698-705.
- RINCÓN- DELGADO, R. M., GUTIÉRREZ-BAÑUELOS, H., PÉREZ-VÁZQUEZ, E. D., MURO-REYES, A., DÍAZ-GARCÍA, L. H., BAÑUELOS-VALENZUELA, R., GUTIÉRREZ, F. J., MEDINA-FLORES, C. A., ESCARENO-SÁNCHEZ, L. M., AGUILERA-SOTO, J. I., LÓPEZ-CARLOS, M. A. & ARECHIGA-FLORES, C. F. 2011. Relationship of residual feed intake on specific hematological and biochemical parameters in rambouillet sheep. *Agricultural Journal*, 6, 87-91.
- ROBINSON, J. K., BLANCHARD, T. G., LEVINE, A. D., EMANCIPATOR, S. N. & LAMM, M. E. 2001. A mucosal IgA-mediated excretory immune system in vivo. *Journal of Immunology*, 166, 3688-3692.
- 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.
- ROUX, M. E., SLOBODIANIK, N. H., GAUFFIN CANO, P. & PERDIGÓN, P. 2008. Mucosal immune system and malnutrition. In: FULLER, R. & PERDIGÓN, G. (eds.) *Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health*. Chichester: Wiley-Blackwell, 155-177.
- 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.
- RUMBALL, C. W., BLOOMFIELD, F. H., OLIVER, M. H. & HARDING, J. E. 2009. Different periods of periconceptional undernutrition have different effects on growth, metabolic and endocrine status in fetal sheep. *Pediatric Research*, 66, 605-613.
- RUSSELL, J. B. & RYCHLIK, J. L. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*, 292, 1119-1122.
- RYTTER, M. J. H., KOLTE, L., BRIEND, A., FRIIS, H. & CHRISTENSEN, V. B. 2014. The immune system in children with malnutrition-A systematic review. *PLoS One*, 9, e105017.
- SADET-BOURGETEAU, S., MARTÍN, C. & MORGAVI, D. P. 2010. Bacterial diversity dynamics in rumen epithelium of wethers fed forage and mixed concentrate forage diets. *Veterinary Microbiology*, 146, 98-104.
- SADET, S., MARTÍN, C., MEUNIER, B. & MORGAVI, D. P. 2007. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal*, 1, 939-944.
- SAHOO, A., PATTANAIK, A. K. & GOSWAMI, T. K. 2009. Immunobiochemical status of sheep exposed to periods of experimental protein deficit and realimentation. *Journal of Animal Science*, 87, 2664-2673.
- SAVARY-AUZELOUX, I., DURAND, D., GRUFFAT, D., BAUCHART, D. & ORTIGUES-MARTY, I. 2008. Food restriction and refeeding in lambs influence muscle antioxidant status. *Animal*, 2, 738-745.
- SCHÄFF, C. T., GRUSE, J., MACIEJ, J., MIELENZ, M., WIRTHGEN, E., HOEFLICH, A., SCHMICKE, M., PFUHL, R., JAWOR, P., STEFANIAK, T. & HAMMON, H. M. 2016. Effects of feeding milk replacer *ad libitum* or in restricted amounts for the first five weeks of life on the growth, metabolic adaptation, and immune status of newborn calves. *PLoS One*, 11, e0168974.
- SCHÄFF, C. T., GRUSE, J., MACIEJ, J., PFUHL, R., ZITNAN, R., RAJSKY, M. & HAMMON, H. M. 2018. Effects of feeding unlimited amounts of milk replacer for the first 5 weeks

- of age on rumen and small intestinal growth and development in dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 101, 783-793.
- SCHLAU, N., GUAN, L. L. & OBA, M. 2012. The relationship between rumen acidosis resistance and expression of genes involved in regulation of intracellular pH and butyrate metabolism of ruminal epithelial cells in steers. *Journal of Dairy Science*, 95, 5866-5875.
- SCHLEIMER, R. P. 2004. Glucocorticoids suppress inflammation but spare innate immune responses in airway epithelium. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 1, 222-230.
- SEBERT, S. P., HYATT, M. A., CHAN, L. L., PATEL, N., BELL, R. C., KEISLER, D., STEPHENSON, T., BUDGE, H., SYMONDS, M. E. & GARDNER, D. S. 2009. Maternal nutrient restriction between early and midgestation and its impact upon appetite regulation after juvenile obesity. *Endocrinology*, 150, 634-641.
- SHAMAY, A., WERNER, D., MOALLEM, U., BARASH, H. & BRUCKENTAL, I. 2005. Effect of nursing management and skeletal size at weaning on puberty, skeletal growth rate, and milk production during first lactation of dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 88, 1460-1469.
- SHARIFABADI, H. R., ZAMIRI, M. J., ROWGHANI, E. & BOTTJE, W. G. 2012. Relationship between the activity of mitochondrial respiratory chain complexes and feed efficiency in fat-tailed Ghezel lambs. *Journal of Animal Science*, 90, 1807-1815.
- SHARPE, M. E., LATHAM, M. J. & REITER, B. 1977. The immune response of the hosts animal to bacteria in the rumen and caecum. In: MCDONALD, I. W. & WARNER, A. C. I., eds. *Proceedings of the IV International Symposium on Ruminant Physiology: Digestion and Metabolism in the Ruminant*. Armidale, Australia: University of New England Publishing Unit, pp. 193-194.
- SILPER, B. F., LANA, A. M., CARVALHO, A. U., FERREIRA, C. S., FRANZONI, A. P., LIMA, J. A., SATURNINO, H. M., REIS, R. B. & COELHO, S. G. 2014. Effects of milk replacer feeding strategies on performance, ruminal development, and metabolism of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 97, 1016-1025.
- SINKORA, M., STEPANOVA, K., BUTLER, J. E., FRANCIS, D., SANTIAGO-MATEO, K., POTOCKOVA, H., KAROVA, K. & SINKOROVA, J. 2011. Ileal Peyer's patches are not necessary for systemic B cell development and maintenance and do not contribute significantly to the overall B cell pool in swine. *Journal of Immunology*, 187, 5150-5161.
- SMITH, J. M., VAN AMBURGH, M. E., DIAZ, M. C., LUCY, M. C. & BAUMAN, D. E. 2002. Effect of nutrient intake on the development of the somatotropic axis and its responsiveness to GH in Holstein bull calves. *Journal of Animal Science*, 80, 1528-1537.
- SNOWDER, G. D. & VAN VLECK, L. D. 2003. Estimates of genetic parameters and selection strategies to improve the economic efficiency of postweaning growth in lambs. *Journal of Animal Science*, 81, 2704-2713.
- 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.
- SOHI, G., MARCHAND, K., REVESZ, A., ARANY, E. & HARDY, D. B. 2011. Maternal protein restriction elevates cholesterol in adult rat offspring due to repressive changes in histone modifications at the cholesterol 7 α -hydroxylase promoter. *Molecular Endocrinology*, 25, 785-798.
- STEELE, M. A., DIONISSOPOULOS, L., ALZAHAL, O., DOELMAN, J. & MCBRIDE, B. W. 2012. Rumen epithelial adaptation to ruminal acidosis in lactating cattle involves the

- coordinated expression of insulin-like growth factor-binding proteins and a cholesterolgenic enzyme. *Journal of Dairy Science*, 95, 318-327.
- STEELE, M. A., VANDERVOORT, G., ALZAHAL, O., HOOK, S. E., MATTHEWS, J. C. & MCBRIDE, B. W. 2011. Rumen epithelial adaptation to high-grain diets involves the coordinated regulation of genes involved in cholesterol homeostasis. *Physiological Genomics*, 43, 308-316.
- STEFANSKA, B., CZLAPA, W., PRUSZYNSKA-OSZMALEK, E., SZCZEPANKIEWICZ, D., FIEVEZ, V., KOMISAREK, J., STAJEK, K. & NOWAK, W. 2018. Subacute ruminal acidosis affects fermentation and endotoxin concentration in the rumen and relative expression of the CD14/TLR4/MD2 genes involved in lipopolysaccharide systemic immune response in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101, 1297-1310.
- STELWAGEN, K., CARPENTER, E., HAIGH, B., HODGKINSON, A. & WHEELER, T. T. 2009. Immune components of bovine colostrum and milk. *Journal of Animal Science*, 87, 3-9.
- STROBER, W., KELSALL, B., FUSS, I., MARTH, T., LUDVIKSSON, B., EHRHARDT, R. & NEURATH, M. 1997. Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunology Today*, 18, 61-64.
- SUÁREZ-SOUTO, M. A., LARA-PADILLA, E., REYNA-GARFIAS, H., VILORIA, M., LÓPEZ-SÁNCHEZ, P., RIVERA-AGUILAR, V., MILIAR-GARCÍA, A., KORMANOVSKI, A., DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, M. L. & CAMPOS-RODRÍGUEZ, R. 2012. Caloric restriction modifies both innate and adaptive immunity in the mouse small intestine. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 68, 163-173.
- SUBHARAT, S., SHU, D., ZHENG, T., BUDDLE, B. M., JANSSEN, P. H., LUO, D. & WEDLOCK, D. N. 2015. Vaccination of cattle with a methanogen protein produces specific antibodies in the saliva which are stable in the rumen. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 164, 201-207.
- SUGINO, N. 2006. Roles of reactive oxygen species in the corpus luteum. *Animal Science Journal*, 77, 556-565.
- TAKEDA, T., SAKATA, M., MINEKAWA, R., YAMAMOTO, T., HAYASHI, M., TASAKA, K. & MURATA, Y. 2004. Human milk induces fetal small intestinal cell proliferation - involvement of a different tyrosine kinase signaling pathway from epidermal growth factor receptor. *The Journal of Endocrinology*, 181, 449-457.
- TALL, A. R. & YVAN-CHARVET, L. 2015. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 15, 104-116.
- TATLI, M. M., VURAL, H., KOC, A., KOSECIK, M. & ATAS, A. 2000. Altered anti-oxidant status and increased lipid peroxidation in marasmic children. *Pediatrics International* 42, 289-292.
- TEN BRUGGENCATE, S. J., HILLYER, L. M. & WOODWARD, B. D. 2001. The proportion of CD45RA(+)/CD62L(+) (quiescent-phenotype) T cells within the CD8(+) subset increases in advanced weight loss in the protein- or energy-deficient weanling mouse. *The Journal of Nutrition*, 131, 3266-3269.
- THOMAS, T. J., WEARY, D. M. & APPLEBY, M. C. 2001. Newborn and 5-week-old calves vocalize in response to milk deprivation. *Applied Animal Behaviour Science*, 74, 165-173.
- TIZARD, I. 2013. *Veterinary Immunology*. 9th ed. Saint Louis, Missouri: Elsevier.
- TODD, C. G., LESLIE, K. E., MILLMAN, S. T., BIELMANN, V., ANDERSON, N. G., SARGEANT, J. M. & DEVRIES, T. J. 2017. Clinical trial on the effects of a free-access

- acidified milk replacer feeding program on the health and growth of dairy replacement heifers and veal calves. *Journal of Dairy Science*, 100, 713-725.
- TÓTHOVÁ, C., NAGY, O. & KOVÁČ, G. 2014. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: A review. *Veterinární Medicína*, 59, 163-180.
- TREVISI, E., AMADORI, M., RIVA, F., BERTONI, G. & BANI, P. 2014. Evaluation of innate immune responses in bovine forestomachs. *Research in Veterinary Science*, 96, 69-78.
- TREVISI, E., MOSCATI, L. & AMADORI, M. 2016. Disease-predicting and prognostic potential of innate immune responses to noninfectious stressors: human and animal models. In: AMADORI, M. (ed.) *The Innate Immune Response to Noninfectious Stressors*. Brescia: Academic Press, 209-235.
- TRUJILLO, A. I. 2015. *Eficiencia alimenticia en bovinos de carne en pastoreo*. [Online]. Available: http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/fpta%2059_2015.pdf [Accessed 12/02/2019].
- TYGESEN, M. P., NIELSEN, M. O., NORGAARD, P., RANVIG, H., HARRISON, A. P. & TAUSON, A. H. 2008. Late gestational nutrient restriction: effects on ewes' metabolic and homeorhetic adaptation, consequences for lamb birth weight and lactation performance. *Archives of Animal Nutrition*, 62, 44-59.
- ULLOA, L., DOODY, J. & MASSAGUE, J. 1999. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature*, 397, 710-713.
- URQUIAGA, I. & LEIGHTON, F. 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, 33, 55-64.
- UYENO, Y., SHIGEMORI, S. & SHIMOSATO, T. 2015. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. *Microbes and Environments*, 30, 126-132.
- VAN SOEST, P. J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2nd ed. Ithaca, New York: Cornell University Press.
- VEITCH, A. M., KELLY, P., ZULU, I. S., SEGAL, I. & FARTHING, M. J. 2001. Tropical enteropathy: a T-cell-mediated crypt hyperplastic enteropathy. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 13, 1175-1181.
- VILLOT, C., MEUNIER, B., BODIN, J., MARTIN, C. & SILBERBERG, M. 2018. Relative reticulo-rumen pH indicators for subacute ruminal acidosis detection in dairy cows. *Animal*, 12, 481-490.
- VOGEL, M. E. & ZUCKER, S. D. 2016. Bilirubin acts as an endogenous regulator of inflammation by disrupting adhesion molecule-mediated leukocyte migration. *Inflammation and Cell Signaling*, 3, e1178.
- VONNAHME, K. A., HESS, B. W., HANSEN, T. R., MCCORMICK, R. J., RULE, D. C., MOSS, G. E., MURDOCH, W. J., NIJLAND, M. J., SKINNER, D. C., NATHANIELSZ, P. W. & FORD, S. P. 2003. Maternal undernutrition from early- to mid-gestation leads to growth retardation, cardiac ventricular hypertrophy, and increased liver weight in the fetal sheep. *Biology of Reproduction*, 69, 133-140.
- WAI, T., GARCIA-PRIETO, J., BAKER, M. J., MERKWIRTH, C., BENIT, P., RUSTIN, P., RUPEREZ, F. J., BARBAS, C., IBANEZ, B. & LANGER, T. 2015. Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. *Science*, 350, aad0116.
- WALLACE, R. J., CHENG, K. J., DINSDALE, D. & ORSKOV, E. R. 1979. An independent microbial flora of the epithelium and its role in the ecomicrobiology of the rumen. *Nature*, 279, 424-426.

- WANG, J., MA, H., TONG, C., ZHANG, H., LAWLIS, G. B., LI, Y., ZANG, M., REN, J., NIJLAND, M. J., FORD, S. P., NATHANIELSZ, P. W. & LI, J. 2010a. Overnutrition and maternal obesity in sheep pregnancy alter the JNK-IRS-1 signaling cascades and cardiac function in the fetal heart. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24, 2066-2076.
- WANG, Y., DEVKOTA, S., MUSCH, M. W., JABRI, B., NAGLER, C., ANTONOPOULOS, D. A., CHERVONSKY, A. & CHANG, E. B. 2010b. Regional mucosa-associated microbiota determine physiological expression of TLR2 and TLR4 in murine colon. *PLoS One*, 5, e13607.
- WANG, Z., LI, C., YANG, Z., MA, J. & ZOU, Z. 2017. Fetal and infant exposure to severe Chinese famine increases the risk of adult dyslipidemia: Results from the China health and retirement longitudinal study. *BMC Public Health*, 17, 488.
- WANG, Z., LI, C., YANG, Z., ZOU, Z. & MA, J. 2016. Infant exposure to Chinese famine increased the risk of hypertension in adulthood: results from the China health and retirement longitudinal study. *BMC Public Health*, 16, 435.
- WEIMER, P. J. 2015. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. *Frontiers in Microbiology*, 6, 296.
- WETZELS, S. U., MANN, E., METZLER-ZEBELI, B. U., WAGNER, M., KLEVENHUSEN, F., ZEBELI, Q. & SCHMITZ-ESSER, S. 2015. Pyrosequencing reveals shifts in the bacterial epimural community relative to dietary concentrate amount in goats. *Journal of Dairy Science*, 98, 5572-5587.
- WETZELS, S. U., MANN, E., POURAZAD, P., QUMAR, M., PINIOR, B., METZLER-ZEBELI, B. U., WAGNER, M., SCHMITZ-ESSER, S. & ZEBELI, Q. 2017. Epimural bacterial community structure in the rumen of Holstein cows with different responses to a long-term subacute ruminal acidosis diet challenge. *Journal of Dairy Science*, 100, 1829-1844.
- WOODS, L. L., INGELFINGER, J. R., NYENGAARD, J. R. & RASCH, R. 2001. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatric Research*, 49, 460-467.
- WOODWARD, B. 1998. Protein, calories, and immune defenses. *Nutrition Reviews*, 56, S84-S92.
- WOODWARD, B., HILLYER, L. & HUNT, K. 1999. T cells with a quiescent phenotype (CD45RA+) are overabundant in the blood and involuted lymphoid tissues in wasting protein and energy deficiencies. *Immunology*, 96, 246-253.
- WOOLDRIDGE, A. L., BISCHOF, R. J., MEEUSEN, E. N., LIU, H., HEINEMANN, G. K., HUNTER, D. S., GILES, L. C., KIND, K. L., OWENS, J. A., CLIFTON, V. L. & GATFORD, K. L. 2014. Placental restriction of fetal growth reduces cutaneous responses to antigen after sensitization in sheep. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 306, R441-R446.
- YAMBAYAMBA, E. S., PRICE, M. A. & FOXCROFT, G. R. 1996. Hormonal status, metabolic changes, and resting metabolic rate in beef heifers undergoing compensatory growth. *Journal of Animal Science*, 74, 57-69.
- YÁÑEZ-RUIZ, D. R., ABECIA, L. & NEWBOLD, C. J. 2015. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1133.
- YASUDA, M., JENNE, C. N., KENNEDY, L. J. & REYNOLDS, J. D. 2006. The sheep and cattle Peyer's patch as a site of B-cell development. *Veterinary Research*, 37, 401-415.

- YE, H., LIU, J., FENG, P., ZHU, W. & MAO, S. 2016. Grain-rich diets altered the colonic fermentation and mucosa-associated bacterial communities and induced mucosal injuries in goats. *Scientific Reports*, 6, 20329.
- ZEINELDIN, M., BARAKAT, R., ELOLIMY, A., SALEM, A. Z. M., ELGHANDOUR, M. M. Y. & MONROY, J. C. 2018. Synergetic action between the rumen microbiota and bovine health. *Microbial Pathogenesis*, 124, 106-115.
- 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. *Scientific Reports*, 7, 12681.

Capítulo I

Early feed restriction of lambs modifies ileal epimural microbiota and affects immunity parameters during the fattening period

Publicado en: *Animal*

Early feed restriction of lambs modifies ileal epimural microbiota and affects immunity parameters during the fattening period

J. Frutos¹, S. Andrés^{1†}, D. R. Yáñez-Ruiz², J. Benavides¹, S. López¹, A. Santos¹, M. Martínez-Valladares¹, F. Rozada¹ and F. J. Giráldez¹

¹Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-Universidad de León, Finca Marzanas s/n, 24346 Grulleros, León, Spain; ²Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda, 1, 18008 Granada, Spain

(Received 2 October 2017; Accepted 15 March 2018)

Bacteria firmly attached to the gastrointestinal epithelium during the pre-weaning phase may show a significant impact on nutrient processing, immunity parameters, health and feed efficiency of lambs during post-weaning phases. Thus, the aim of this study was to describe the differences in the ileal epimural microbiota (e.g. total bacteria, Prevotella spp., Bifidobacterium spp. and Lactobacillus spp.) of fattening lambs promoted by early feed restriction during the suckling phase trying to elucidate some of the underlying mechanisms behind changes in feed efficiency during the fattening period. A total of 24 Merino lambs (average BW 4.81 ± 0.256 kg) were used, 12 of them (ad libitum, ADL) kept permanently in individual pens with their mothers, whereas the other 12 lambs were separated from their dams for 9 h each day to be exposed to milk restriction (RES). After weaning (BW = 15 kg) all the animals were penned individually, offered the same complete pelleted diet (35 g/kg BW per day) and slaughtered at a BW of 27 kg. During the fattening period, reduced gain : feed ratio (0.320 v. 0.261, P < 0.001) was observed for the RES group. Moreover, increments of Prevotella spp. were detected in the ileal epimural microbiota of RES lambs (P < 0.05). There were also higher numbers of infiltrated lymphocytes (T and B cells) in the ileal lamina propria (P < 0.05), a higher M-cell labelling intensity in ileal Peyer's patches domes (P < 0.05) and a trend towards a thickening of the submucosa layer when compared with the ADL group (P = 0.057). Some other immunological parameters, such as an increased immunoglobulin A (IgA) production (pg IgA/μg total protein) and increments in CD45+ cells were also observed in the ileum of RES group (P < 0.05), whereas transforming growth factor β and toll-like receptor gene expression was reduced (P < 0.05). In conclusion, early feed restriction during the suckling phase promoted changes in ileal epimural microbiota and several immunity parameters that could be related to differences in feed efficiency traits during the fattening period of Merino lambs.

Keywords: feed efficiency, Peyer's patches, *Prevotella* spp., inflammation, metabolic programming

Implications

Differences in epimural microbiota and immunity parameters at ileal level together with reduced feed efficiency of fattening lambs are described as a consequence of early feed restriction during the suckling period. This information may allow implementing different strategies to increase feed efficiency of early feed restricted animals (udder problems, lack of lamb vitality or low milk production), thus reducing the units of feedstuff consumed by the animal during the fattening period to produce a kilogram of meat and increasing the profitability for the farm.

Introduction

The World Organization for Animal Health has estimated that ~20% of animal production is lost due to unhealthy animals. This is due to the fact that immune defenses are energetically very expensive, so nutritional resources directed towards an immune response are removed from other functions such as growth (Rauw, 2012). Therefore, in order to increase animal performance, is fundamental to understand the different factors modulating the immune response (Animal Task Force, 2013).

One of these factors might be related to early feed restriction of animals (Greenwood and Cafe, 2007) during the postnatal phases, when the colonization of mucosal epithelium of the gastrointestinal tract by commensal bacteria takes place (Taschuk and Griebel, 2012). Interestingly, once established the epimural microbiota seems to be less

[†] Present address: Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-Universidad de León, Finca Marzanas s/n, 24346 Grulleros, León, Spain.

[†] E-mail: sonia.andres@eae.csic.es

influenced by the diet than microbiota associated to digesta contents (Petri *et al.*, 2013; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2015), so any factor (e.g. early feed restriction) modifying the composition of the microbiota firmly attached to these cells may modulate not only the nutrient processing (Santos *et al.*, 2018a and 2018b) but also the gut-associated lymphoid tissue, thus exerting nutritional programming of immune health and hence long-term effects on lifetime feed efficiency.

However, even though several studies have described the composition of microbiota in the rumen, jejunum, colon and caecum contents of steers or lambs differing in feed efficiency (Myer *et al.*, 2015a, 2015b, 2015c and 2016; Santos *et al.*, 2018b), there are scarce studies focused on ileal epimural microbiota of ruminants (Mao *et al.*, 2015). This is surprising, as ileum is involved not only in nutrient absorption but also in the development of immune response (ileal Peyer's patches, iPP) during early life. Moreover, ileum is a far smaller, physiologically and anatomically homogeneous region of the small intestine (Verdonk *et al.*, 2001). Consequently, ileum was chosen as the target region of the small intestine in order to study if both ileal epimural microbiota and some parameters related to the mucosal associated lymphoid tissue are altered by early feed restriction, thus promoting long-term effects on feed efficiency traits of Merino lambs during the fattening period. Our working hypothesis was that early feed restriction modifies both ileal epimural microbiota and immunity parameters at this level, thus adversely impacting feed efficiency traits during the fattening period of Merino lambs.

Material and methods

Animals and diets

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).

A total of 24 male Merino lambs, penned individually with their corresponding ewe during the suckling period, were used in this experiment. The lambs were stratified on the basis of live BW at birth (average BW 4.81 ± 0.256 kg), treated with a subcutaneous injection of vitamin E and Se (1 ml per animal of Selevit Complex, Syva) to prevent white muscle disease, and then assigned randomly to one of 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 sheep whereas the other group (restricted, RES) was separated from the dams from 0900 to 1800 h and milk restricted. Dams of the RES group were injected with oxytocin to remove alveolar milk and then milked at 1700 h before the reintroduction of lambs. Lambs were weighed twice a week throughout the experiment and vaccinated against enterotoxaemia and *pasteurella* (Heptavac P Plus, MSD Animal Health) at 4 weeks of age. When each lamb reached 13.5 kg of BW it was

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

Ingredients (g/kg)	
Barley	433
Corn	150
Soya bean meal 44	237
Barley straw	150
Vitamin–mineral premix ¹	30
Chemical composition (g/kg DM)	
DM (g/kg)	900
NDF	227
ADF	121
CP	174
Fat	30
Ash	68
Metabolizable energy (kcal/kg DM)	2464

¹10 g/kg CaCO₃, 5 g/kg NaCl, 7 g/kg NaHCO₃, 4 g/kg CaHPO₄, 2 g/kg ClNH₄, 2 g/kg premix (manufactured by DMS Nutritional Products, S.A. and containing (per kg) 2.25 g vitamin A, 0.02 g vitamin D₃, 10 g vitamin E, 0.25 g vitamin K₃, 0.50 g vitamin B₁, 0.50 g vitamin B₂, 2.50 g vitamin B₅, 0.50 g vitamin B₆, 5 g vitamin B₁₂, 5 g vitamin B₃, 50 g choline chloride, 17.50 g Fe, 15 g Zn, 2.5 g Cu, 20 g Mn, 0.05 g Co, 0.25 g I, 0.10 g Se, 259 g Ca and 50.5 g Mg).

weaned progressively (free access to a complete pelleted diet and alfalfa, whereas it was allowed only 2 h with the dam) until it weighed 15 kg. Then, all the animals were penned individually, had free access to fresh drinking water and were offered the same complete pelleted diet at the same level (35 g/kg BW per day) to avoid differences in DM intake during the fattening period as explained elsewhere (Santos *et al.*, 2018b). The average daily gain was calculated by linear regression between the lamb BW and the weighing day. All the lambs received the complete pelleted diet once a day at 0900 h, with the amount of feed offered being adjusted twice a week on the basis of the BW. Ingredients and chemical composition of the complete pelleted diet are summarized in Table 1.

Sampling and storage

All the animals were slaughtered after a fattening period of at least 50 days when they reached the target BW of 27 kg. Feed was withdrawn 6 h before slaughtering; then lambs were weighed, stunned, slaughtered by exsanguination from the jugular vein, eviscerated and skinned according to the Council Regulation (EC) No. 1099/2009 on the protection of animals at the time of killing. A 10 cm segment of ileum was collected proximal to the ileocecal valve immediately after slaughter. Ileal samples were rinsed three times with sterile phosphate-buffered saline solution to remove the digesta and divided into several portions. Tissue samples were preserved in different ways for analysis of microbial composition (stored at -80°C during 48 h, then freeze-dried), flow cytometry (sterile phosphate-buffered saline solution), histological or immunohistochemical examination (fixed by immersion in 10% buffered formalin for 1 week), immunoglobulin A (IgA) quantification (stored at -20°C), and gene expression (RNA_{later} Invitrogen, Lithuania; stored at -80°C).

DNA extraction and quantitative real-time polymerase chain reaction of bacteria attached to the ileal mucosa

The luminal part of the freeze-dried ileal mucosa (15 mg) was scraped with a scalpel and subsequent microbial DNA purification with the Ultra-Deep Microbiome Prep kit (Molzym, Bremen, Germany) was performed according to manufacturer's instructions. The concentration of DNA was measured in each sample with a NanoDrop UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), and then quantitative real-time PCR was used to quantify total bacteria attached to the ileal mucosa and the relative abundance of some genus very related to the health status of the host (e.g. *Prevotella* spp., *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp.) according to the procedures described by Andrés *et al.* (2016), Vargas *et al.* (2017) and Delroisse *et al.* (2008), respectively. Finally, quantitative real-time PCR data were normalized according to the previous concentration of DNA, and results were expressed as fold change (\log_2 of 'number of copies' per milligram of genomic DNA, RES/ADL) of overrepresented species in ileal epimural microbiota (positive value if RES/ADL > 1; negative value if ADL/RES > 1).

Mechanical disruption of ileal tissue and flow cytometry

In order to quantify leucocyte population in the ileum, a single colour flow cytometry analysis was performed. Mucosal leucocytes were labelled with the leucocyte common antibody CD45 (Charavaryamath *et al.*, 2011). The mucosa of ileal samples was scraped off with a scalpel; the homogenates were mixed with 8 ml of cold phosphate-buffered saline solution (pH 7.4) and digested in a masticator paddle blender (IUL Instruments, Barcelona, Spain). Contents were filtered, added carefully to 8 ml of Lymphoprep (Axis-Shield PocAS, Oslo, Norway) and centrifuged at $1000 \times g$ and $21^\circ C$ for 30 min. Layer of leucocytes was extracted, moved to a falcon tube with 20 ml of Hanks' Balanced Salt Solution at $4^\circ C$ and centrifuged at $270 \times g$ and $4^\circ C$ for 10 min. Then, the pellet was washed twice by centrifugation at $270 \times g$ and $4^\circ C$ for 10 min in RPMI 1640 medium with 10% foetal bovine serum (Lonza, Basilea, Switzerland) and 1% antibiotic antimycotic solution. The pellet was re-suspended in 5 ml cold of RPMI–foetal bovine serum. Cells were counted using Bio-Rad TC10 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and adjusted with RPMI–foetal bovine serum to a final concentration of 2×10^6 cells/ml. For antibody labelling, briefly, 50 μ l of suspension were incubated for 60 min at $4^\circ C$ with a specific primary monoclonal antibody against CD45 antigen (Corpa *et al.*, 2001) diluted 1 : 5 in phosphate-buffered saline solution, centrifuged at $142 \times g$ and $4^\circ C$ for 3 min, washed twice by centrifugation at $270 \times g$

and $4^\circ C$, then re-incubated for 30 min at $4^\circ C$ in the dark with 50 μ l of fluorescein isothiocyanate conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin (Dako, Glostrup, Denmark) diluted 1 : 50. After two further washes, cells were kept at $4^\circ C$ until analysis on a FACScan flow cytometer (BD, San Jose, CA, USA) equipped with CellQuest software (BD). Results were expressed as the percentage of positive stained cells in sample populations of 10 000 individual cells.

Histological and morphometric analysis

Formalin-fixed samples from ileum were trimmed and processed for paraffin embedding and histological examination (haematoxylin–eosin staining). Slides were examined with a Leica DM2000 LED microscope and digital pictures were taken at $4 \times$ magnification. Thickness of mucosa, submucosa and *tunica muscularis* was measured at 10 different sites in each picture using the image processing and analysis software ImageJ v1.6.0_14 (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA).

Immunohistochemical analysis

Immunohistochemical analysis was performed according to the procedure described by Arranz-Solís *et al.* (2016). Briefly, cross sections were cut from the ileum wall samples and placed onto poly-L-lysine-coated slides for immunohistochemical labelling of T (CD3 antigen), B (CD20 antigen) and M-cells (cytokeratin 18 antigen). Endogenous peroxidase activity was blocked in deparaffinized sections by immersion in 3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min in darkness at room temperature and rehydrated slides were rinsed. The antigen retrieval was performed using heat-based methods (Table 2). After washing, sections were incubated with 100 μ l of the primary antibodies diluted in phosphate-buffered saline solution overnight at $4^\circ C$ in a humidified chamber.

After washing, sections were incubated for 40 min at room temperature with 100 μ l of EnVision + /HRP solution (Dako, Glostrup, Denmark). After washing, antibody localization was determined using 100 μ l of 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich Corp., Saint Louis, MO, USA) as chromogenic substrate for peroxidase. Sections were counterstained with haematoxylin for 30 s and mounted. Quantification of labelled cells was performed under a light microscope with a $40 \times$ objective. The number of T and B cells was counted in ten random fields within the lamina propria of the ileum.

Quantification of M-cells labelling intensity was performed measuring the % of positive labelled area in the total area of epithelial cells in IPP dome with the plugin IHC Profiler (Varghese *et al.*, 2014) of ImageJ. Domes were photographed

Table 2 Primary antibodies used in immunohistochemistry of ileal samples from fattening lambs

Target	Cell population	Type	Antigen retrieval	Dilution	Source
CD3	T lymphocytes	Polyclonal antibody A-0452	Heat induced, pH 6.0, citrate buffer	1:300	Dako, Denmark
Cytokeratin 18	M-cells	Monoclonal antibody C-04	Heat induced, pH 6.0, citrate buffer	1:750	Abcam, United Kingdom
CD20	B lymphocytes	Polyclonal antibody RB-9013-P	None	1:200	Thermo Fisher, Spain

CD = cluster of differentiation.

under a 20× objective, and epithelial cells of domes were delimited as regions of interest. Positive labelling was automatically measured by the software.

Ileal mucosa antibody recovery and immunoglobulin A quantification

Immunoglobulin A was quantified according to the procedure described by Ahmed *et al.* (2015). Briefly, ileal samples were unfrozen overnight at 4°C; then the surface was scraped with a scalpel and 2 g were collected in a falcon tube with 6 ml of ice cold phosphate-buffered saline solution supplemented with protease inhibitors (Sigma-Aldrich Corp.). Samples were vortexed, incubated overnight at 4°C and centrifuged at 3000 × g for 30 min at 4°C. Protein concentration of each supernatant was measured with the Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and adjusted to 500 µg/ml using phosphate-buffered saline solution supplemented with protease inhibitors. The amount of IgA was measured in ileal mucosa using a Genorise ELISA IgA kit following manufacturer's instructions (Genorise Scientific, Devon-Berwyn, PA, USA).

RNA extraction and real-time reverse transcription polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from 100 mg of ileal samples (including iPP) according to the procedure described by Abecia *et al.* (2017). Briefly, samples were homogenized with 0.9 mm stainless steel bead and 1 ml of TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), using a Bullet Blender homogenizer (Next Advance, Troy, NY, USA). The homogenate was incubated for 5 min at room temperature before adding 200 µl chloroform/ml of TRIzol-containing tissue homogenate. The aqueous phase was precipitated with 500 µl isopropanol/ml of TRIzol-containing tissue homogenate, and applied to an RNeasy Mini-column (Qiagen, Hilden, Germany). RNA bound to the column was DNase treated using RNase-Free DNase Set (Qiagen) and collected in 50 µl volume eluent. The RNA quantity was measured using ND 1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and RNA integrity number was evaluated using Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Total RNA (1 µg) was reversed transcribed using QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. RNA was used as template for real-time reverse transcription PCR analysis to evaluate the expression of genes encoding 10 toll-like receptors (TLRs) in the ileal epithelium using the gene-specific primer pairs described in Malmuthuge *et al.* (2012) relative to β -actin expression whereas for cytokines the amplification conditions and primers were those described by Martínez-Pérez *et al.* (2014). For each PCR reaction, 25 ng of cDNA were amplified with each primer set using the parameters described by Abecia *et al.* (2017) on the Bio-Rad iCycler (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada). Amplification data were expressed as change in quantification cycle (ΔC_q value) and calculated as follows: $\Delta C_q = C_q$ (cytokines or TLRs) – C_q (β -actin). A smaller ΔC_q value equates to more abundant transcript.

Statistical analysis

Growth performance data together with those of quantification of microbiota, flow cytometry, morphometric analysis, immunohistochemistry, IgA quantification and gene expression were analysed by one-way ANOVA using the GLM procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) with the suckling regime (*ad libitum* or restricted) as the only source of variation. In all cases, the individual lamb was considered as the experimental unit. Significance was declared at $P < 0.05$.

Results

Animal performance

Average daily gain during the suckling phase was reduced for RES lambs (267 v. 191 g/day; $P < 0.001$) and the age at weaning (BW of 15 kg) increased (42 v. 55 days; $P < 0.001$). Furthermore, significant differences in gain to feed ratio (average daily gain/DM intake) were observed during the fattening phase (0.320 v. 0.261 for the ADL and RES groups, respectively; $P < 0.001$) despite the similar DM intake during this period of time. Thus, RES animals required more days (74 v. 62 days; $P < 0.001$) to reach the intended BW at slaughter (27 kg).

Ileal epimural microbiota

No differences were observed for total bacteria, *Lactobacillus* spp. or *Bifidobacterium* spp. between experimental groups (ADL v. RES lambs, Figure 1). However, a significant increase of the relative abundance of *Prevotella* spp. in the ileal epimural microbiota of early feed restricted lambs was detected (Figure 1; $\log_2 FC = 2.09$).

Immunity parameters

The results regarding the counts of CD45+ cells (flow cytometry), thickness of ileal layers (histologic examination), M-cells labelling intensity, B or T infiltrating lymphocytes counts (immunohistochemistry), and IgA concentration in ileal mucosa (ELISA) are summarized in Table 3.

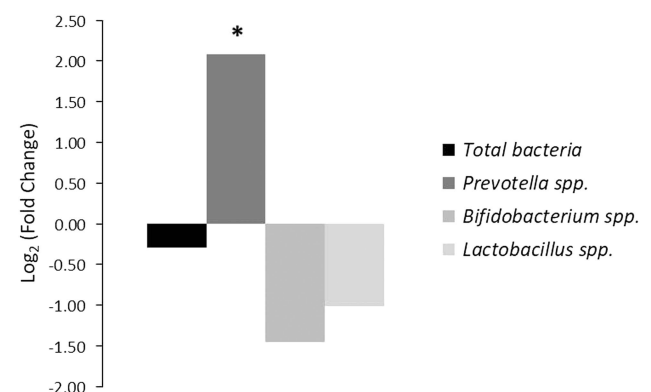


Figure 1 (colour online) Relative quantitation compared with *ad libitum* lambs (ADL) of 16S rRNA copy numbers of microbial groups attached to the ileal mucosa after early feed restriction (RES) during the suckling period. Fold-changes for specific amplicon groups were calculated as \log_2 ratio of normalized abundances. *Significant difference in copy number ($P < 0.05$) was calculated using Tukey's method (SAS).

Table 3 Leucocyte counts measured by flow cytometry in the ileum, thickness of ileal layers, infiltrating lymphocyte counts in ileal lamina propria, intensity of staining of M-cells in ileal mucosa and ileal immunoglobulin A concentration of fattening lambs being fed ad libitum (ADL) or restricted (RES) during the suckling period

	ADL	RES	RSD	P-value
Leucocytes (%)				
CD45 positive	9.80	23.0	13.08	0.049
Thickness (µm)				
Mucosa	2279	2264	374.9	0.927
Submucosa	3376	3958	674.4	0.057
Muscular	481	480	86.8	0.979
Lymphocytes (number per field 40×)				
CD20 positive (B cells)	4.51	5.92	1.142	0.007
CD3 positive (T cells)	196	249	57.3	0.042
Intensity of cytokeratin 18 positive (M-cells)				
High positive	0.072	0.682	0.7148	0.081
Medium positive	2.00	6.78	3.434	0.008
Low positive	43.1	53.3	15.97	0.182
Negative	54.8	39.2	17.39	0.067
IgA (pg IgA/µg total protein)	22.7	28.7	5.60	0.037

RSD = residual standard deviation; CD = cluster of differentiation; IgA = immunoglobulin A.

Greater percentages for CD45+ were detected in the ileum of the RES group when compared with the ADL lambs ($P=0.049$). Moreover, morphometric analysis revealed a trend towards a greater thickness of ileal submucosa layer in the RES group ($P=0.057$) where the iPP are located (Figure 2). Likewise, a higher infiltration of B and T cells in the ileal lamina propria was observed in the RES lambs ($P=0.007$ and 0.042 , respectively; Table 3; Figure 2). Also, significantly higher percentages of the epithelium region in the iPP domes were labelled with high ($P=0.068$) or medium intensity ($P=0.008$) when M-cell marker was assessed in the RES group (Table 3; Figure 2), whereas those negatively labelled showed a trend towards being significantly higher ($P=0.067$) in the ADL group. Similarly, secretory IgA at ileal mucosa level was greater for the early feed restricted lambs ($P=0.037$).

Cytokines and TLRs gene expression at the ileal epithelium (including iPP) is shown in Table 4. No significant differences in mRNA expression of interferon gamma (IFN- γ), interleukin 4 (IL-4) and interleukin 10 (IL-10) were observed. However, transforming growth factor beta (TGF- β) was down-expressed in the RES group ($P=0.043$). In addition, gene expression of several genes was significantly downregulated in the early feed restricted group (e.g. TLR₃, $P=0.022$; TLR₇, $P=0.012$; and TLR₁₀, $P=0.016$).

Discussion

Early feed restriction may impact colonization patterns of gastrointestinal mucosa during early postnatal period and immunity parameters at this level, thus promoting signalling events along the lifespan of the animal and adversely

impacting feed efficiency during post-weaning phases (Greenwood and Cafe, 2007).

In the present study, the number of total bacteria attached to enterocytes was similar in both groups; nevertheless a higher presence of *Prevotella* spp. in the ileal epimural microbiota of the RES group was observed. *Prevotella* spp. strains are Gram-negative, anaerobic bacteria showing multiple virulence factors such as lipopolysaccharide, which facilitate the adhesion and invasion of host cells and chronic inflammatory conditions in the gut (Lukens *et al.*, 2014; Ley, 2016). It must be remarked that these studies are relative to humans, whereas there is scarce information about the role of *Prevotella* spp. in the intestine of ruminants (Mao *et al.*, 2015). However, it is tempting to speculate that the adhesion of *Prevotella* spp. to the ileal mucosa might have promoted pro-inflammatory conditions at this level and, consequently, lower feed efficiency traits for this group of animals as will be explained below. In any case, in accordance with our results, the relative abundance of *Prevotella* spp. has been shown to be increased in the ruminal liquid of inefficient (high residual feed intake) bulls (McCann *et al.*, 2014) and in the colon from steers showing low feed efficiency traits (Myer *et al.*, 2015c). Regrettably, the reasons behind different efficiency traits in these studies were not ascertained.

The outgrowth of *Prevotella* spp. has been described to occur with a concomitant reduction in the relative abundance of lactic acid bacteria such as *Lactobacillus* spp. in the intestinal microbiome, especially under autoinflammatory disease conditions (Lukens *et al.*, 2014). This is important, as *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. are beneficial organisms due in part to their ability to attach to enterocytes, thus inhibiting the binding of enteric pathogens by competitive exclusion. Lactic acid bacteria also generate signals for the production of cytokines modulating immune response, and decreasing inflammatory-intestinal damage (Villena *et al.*, 2014; Lim *et al.*, 2016). However, in the present study, although numerically lower values were observed for these bacterial groups in the RES lambs, the differences in the abundance of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. did not reach the significance level, probably due to the low levels of these bacterial groups detected in both groups of lambs.

In addition, a clear influence of early feed restriction in several parameters related to the immune response was observed according to the results of the present study. In this sense it was enticing to speculate, and warrants further investigation, that the differences in the colonization of gastrointestinal mucosa promoted by early feed restriction during the suckling period of these lambs might have triggered those changes found in the immunological parameters evaluated. In fact, it has been suggested that a different exposure to pathogenic bacteria might alter the ontology of M-cells, which are essentially epithelial cells of the gastrointestinal mucosa specialized in sampling and translocating luminal antigens to the underlying lymphoid tissue (Prims *et al.*, 2017). Therefore, a plausible hypothesis explaining these variations would be that the increased relative

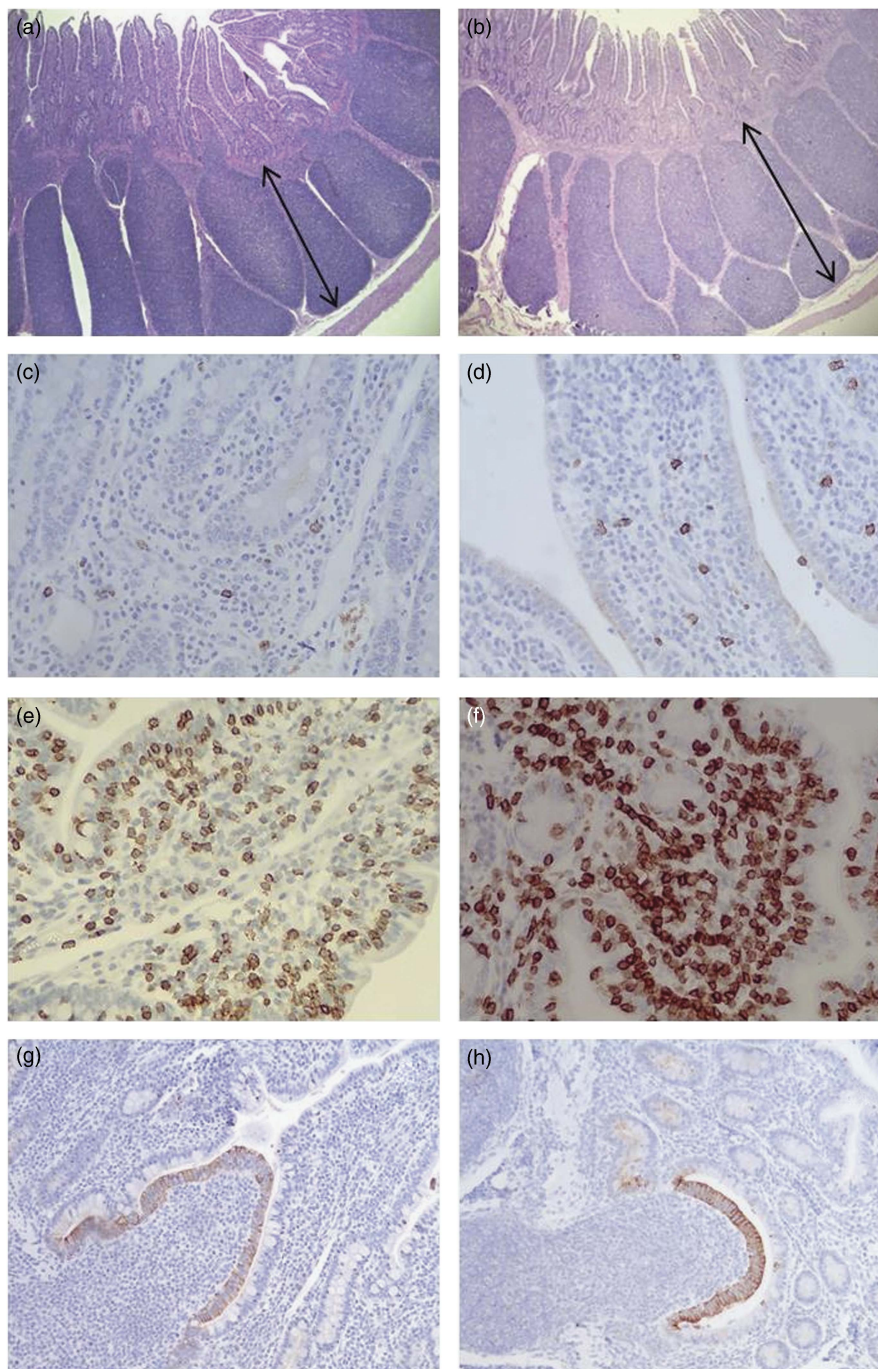


Figure 2 (colour online) Thickness of submucosa layer (arrows) in ileal segments of *ad libitum* (ADL) (a) and early feed restricted (RES) lambs (b). B cells labelled in the lamina propria of ADL (c) and RES lambs (d). T cells labelled in the lamina propria of ADL (e) and RES animals (f). Cytokeratin 18 labelling (M-cells) in Peyer's patches domes of ADL (g) and RES lambs (h). Magnification was 4× for pictures A and B; 40× for pictures (c, d, e and f); and 20× for pictures (g) and (h).

abundance of *Prevotella* spp. in the RES group might have contributed to enhance the expression of cytokeratin 18 antigen in the surface of M-cells, as suggested by the higher staining intensity of M-cells in the iPP domes of these animals. This is important, as the expression of cytokeratin 18 has been related to the M-cell function (e.g. antigen uptake; Gebert *et al.*, 1994; Prims *et al.*, 2017). Thus, this circumstance might explain, at least partially, the higher levels of CD45+ (flow cytometry), the higher infiltrations of B and

T cells in the lamina propria, and the trend towards a greater thickness of the ileal submucosa layer (where iPP are located) in the RES lambs. In any case, the analysis of a more diverse immune cell population and *in vitro* functional studies are necessary to adequately evaluate this hypothesis.

Moreover, there were also significant differences between both groups of lambs as far as the amount of IgA in the ileal mucosa is concerned. IgA works across the gastrointestinal tract as an inhibitor of bacterial/viral adherence and penetration

Table 4 Cytokines and toll-like receptors (TLRs) mRNA expression in the ileal mucosa of fattening lambs being fed ad libitum (ADL) or restricted (RES) during the suckling period

	ADL	RES	RSD	P-value
Cytokines (ΔC_q)				
IFN- γ	12.5	12.2	0.79	0.427
TGF- β	5.60	5.87	0.264	0.049
IL-4	13.6	13.8	0.84	0.589
IL-10	10.3	10.2	0.42	0.785
TLR (ΔC_q)				
TLR ₁	7.58	8.28	1.249	0.202
TLR ₂	19.8	19.1	2.95	0.798
TLR ₃	11.8	12.8	0.91	0.022
TLR ₄	8.60	8.96	0.933	0.389
TLR ₅	20.6	21.0	1.27	0.423
TLR ₆	7.83	8.30	1.013	0.139
TLR ₇	9.48	10.3	1.239	0.012
TLR ₈	8.13	8.78	0.795	0.080
TLR ₉	9.16	9.63	0.936	0.260
TLR ₁₀	8.72	10.3	1.495	0.016

C_q = quantification cycle. $\Delta C_q = C_{q(\text{cytokines or TLRs})} - C_{q(\beta\text{-actin})}$. Lower C_q represents higher RNA abundance level; IFN- γ = interferon gamma; TGF- β = transforming growth factor beta; IL-4 = interleukin 4; IL-10 = interleukin 10; RSD = residual standard deviation.

into the underlying epithelium, providing mucosal immune protection (Cerutti and Rescigno, 2008). Therefore, it might be feasible to have a higher concentration of ileal IgA in the RES group produced to neutralize microbial products such as lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells.

Finally, no differences in the level of expression of several cytokines were observed excepting for TGF- β , which was reduced in the RES lambs. According to Letterio and Roberts (1998) the downregulation of this cytokine in the RES group might be indicative of the existence of a negative regulatory mechanism to reduce lymphocytes infiltration in the lamina propria and the inflammatory response. In agreement with this hypothesis, the downregulation of some TLRs (pattern-recognition receptors of pathogen-associated molecular patterns located in several cell types such as macrophages, T and B cells or non-immune cells) observed in the ileal mucosa of RES lambs might have been implemented in an attempt to keep the homeostasis at intestinal level (Zhang and Ghosh, 2002; Malmuthuge *et al.*, 2012; Villena *et al.*, 2014). However, as stated beforehand, further functional studies are necessary to adequately evaluate this hypothesis.

Conclusions

Early feed restriction during the suckling period of Merino lambs modifies both bacterial microbiota attached to the ileum and immunity parameters at this level. These changes might be related to a decreased amount of nutrients towards productive processes (e.g. growth or fattening) during the fattening period. Actions to improve gut microbiome towards a healthier profile (e.g. prebiotics, probiotics, and nutritional management to decrease *Prevotella* spp. abundance) should

be tested during the early life of lambs as a feasible way to minimize the negative effects on feed efficiency of those animals exposed to feed restriction during the suckling period.

Acknowledgements

This work was funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO, AGL2014-54124R). The authors would also like to thank MINECO (BFU2014-57964-R) for TLR quantification and CSIC (Proyecto Intramural Especial; Project 201540E084) for supporting J. Frutos with a training contract. Alba Santos gratefully acknowledges receipt of a pre-doctoral grant from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (MECD, FPU15/01630). María Martínez-Valladares was funded by the Spanish 'Ramón y Cajal' Programme of the Ministry of Economy and Competitiveness (RYC-2015-18368).

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

- Abecia L, Jiménez E, Martínez-Fernández G, Martín-García AI, Ramos-Morales E, Pinloche E, Denman SE, Newbold CJ and Yáñez-Ruiz DR 2017. Natural and artificial feeding management before weaning promote different rumen microbial colonization but not differences in gene expression levels at the rumen epithelium of newborn goats. *PLoS One* 12, e0182235.
- Ahmed AM, Sebastiano SR, Sweeney T, Hanrahan JP, Glynn A, Keane OM, Mukhopadhyaya A, Thornton K and Good B 2015. Breed differences in humoral and cellular responses of lambs to experimental infection with the gastrointestinal nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary Research* 46, 8.
- Andrés S, Bodas R, Tejido ML, Giráldez FJ, Valdés C and López S 2016. Effects of the inclusion of flaxseed and quercetin in the diet of fattening lambs on ruminal microbiota, in vitro fermentation and biohydrogenation of fatty acids. *Journal of Agricultural Science* 154, 542–552.
- Animal Task Force 2013. Research & innovation for a sustainable livestock sector in Europe. Retrieved on 12 March 2018 from <http://www.animaltaskforce.eu/Portals/0/ATF/horizon2020/ATF%20white%20paper%20Research%20priorities%20for%20a%20sustainable%20livestock%20sector%20in%20Europe.pdf>.
- Arranz-Solís D, Benavides J, Regidor-Cerrillo J, Horcajo P, Castaño P, Ferreras MC, Jiménez-Pelayo L, Collantes-Fernández E, Ferre I, Hemphill A, Pérez V and Ortega-Mora LM 2016. Systemic and local immune responses in sheep after *Neospora caninum* experimental infection at early, mid and late gestation. *Veterinary Research* 47, 2.
- Cerutti A and Rescigno M 2008. The biology of intestinal IgA responses. *Immunity* 28, 740–750.
- Charavaryamath C, Fries P, Gomis S, Bell C, Doig K, Guan LL, Potter A, Napper S and Griebel PJ 2011. Mucosal changes in a long-term bovine intestinal segment model following removal of ingesta and microflora. *Gut Microbes* 2, 134–144.
- Corpa JM, Juste RA, Marín JFG, Reyes LE, González J and Pérez V 2001. Distribution of lymphocyte subsets in the small intestine lymphoid tissue of

- 1-month-old lambs. *Anatomia Histologia Embryologia*-Journal of Veterinary Medicine Series C 30, 121–127.
- Delroisse JM, Boulvin AL, Parmentier I, Dauphin RD, Vandenbol M and Portetelle D 2008. Quantification of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. in rat fecal samples by real-time PCR. *Microbiological Research* 163, 663–670.
- Gebert A, Rothkotter HJ and Pabst R 1994. Cytokeratin-18 is an M-cell marker in porcine Peyer's patches. *Cell and Tissue Research* 276, 213–221.
- Greenwood PL and Cafe LM 2007. Prenatal and pre-weaning growth and nutrition of cattle: long-term consequences for beef production. *Animal* 1, 1283–1296.
- Letterio JJ and Roberts AB 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual Review of Immunology* 16, 137–161.
- Ley RE 2016. Gut microbiota in 2015: *Prevotella* in the gut: choose carefully. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 13, 69–70.
- Lim SM, Jeong JJ, Jang SE, Han MJ and Kim DH 2016. A mixture of the probiotic strains *Bifidobacterium longum* CH57 and *Lactobacillus brevis* CH23 ameliorates colitis in mice by inhibiting macrophage activation and restoring the Th17/Treg balance. *Journal of Functional Foods* 27, 295–309.
- Lukens JR, Gurung P, Vogel P, Johnson GR, Carter RA, McGoldrick DJ, Bandi SR, Calabrese CR, Vande Walle L, Lamkanfi M and Kanneganti TD 2014. Dietary modulation of the microbiome affects autoinflammatory disease. *Nature* 516, 246–249.
- Malmuthuge N, Li M, Fries P, Griebel PJ and Guan LL 2012. Regional and age dependent changes in gene expression of Toll-like receptors and key antimicrobial defence molecules throughout the gastrointestinal tract of dairy calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 146, 18–26.
- Mao S, Zhang M, Liu J and Zhu W 2015. Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function. *Scientific Reports* 5, 16116.
- Martínez-Pérez JM, Robles-Pérez D, Rojo-Vázquez FA and Martínez-Valladares M 2014. Immunological features of LPS from *Ochrobactrum intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Science* 97, 329–332.
- McCann JC, Wiley LM, Forbes TD, Rouquette FM Jr and Tedeschi LO 2014. Relationship between the rumen microbiome and residual feed Intake-efficiency of Brahman bulls stocked on bermudagrass pastures. *PLoS One* 9, e91864.
- Myer PR, Smith TPL, Wells JE, Kuehn LA and Freetly HC 2015a. Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. *PLoS One* 10, e0129174.
- Myer PR, Wells JE, Smith TPL, Kuehn LA and Freetly HC 2015b. Cecum microbial communities from steers differing in feed efficiency. *Journal of Animal Science* 93, 5327–5340.
- Myer PR, Wells JE, Smith TPL, Kuehn LA and Freetly HC 2015c. Microbial community profiles of the colon from steers differing in feed efficiency. *Springerplus* 4, 454.
- Myer PR, Wells JE, Smith TPL, Kuehn LA and Freetly HC 2016. Microbial community profiles of the jejunum from steers differing in feed efficiency. *Journal of Animal Science* 94, 327–338.
- Petri RM, Schwaiger T, Penner GB, Beauchemin KA, Forster RJ, McKinnon JJ and McAllister TA 2013. Changes in the rumen epimural bacterial diversity of beef cattle as affected by diet and induced ruminal acidosis. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 3744–3755.
- Prims S, Pintens N, Vergauwen H, Van Cruchten S, Van Ginneken C and Casteleyn C 2017. Effect of artificial rearing of piglets on the volume densities of M cells in the tonsils of the soft palate and ileal Peyer's patches. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 184, 1–7.
- Rauw WM 2012. Immune response from a resource allocation perspective. *Frontiers in Genetics* 3, 267.
- Santos A, Giráldez FJ, Trevisi E, Lucini L, Frutos J and Andrés S 2018a. Liver transcriptomic and plasma metabolomic profiles of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period. *Journal of Animal Science*, <https://doi.org/10.1093/jas/sky029>, Published online by Oxford University Press 19 February 2018.
- Santos A, Valdés C, Giráldez FJ, López S, France J, Frutos J, Fernández M and Andrés S 2018b. Feed efficiency and the liver proteome of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period. *Animal*, <https://doi.org/10.1017/S1751731118000046>, Published online by Cambridge University Press 24 January 2018.
- Taschuk R and Griebel PJ 2012. Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract. *Animal Health Research Reviews* 13, 129–141.
- Vargas JE, Andrés S, Snelling TJ, López-Ferreras L, Yáñez-Ruiz DR, García-Estrada C and López S 2017. Effect of sunflower and marine oils on ruminal microbiota, in vitro fermentation and digesta fatty acid profile. *Frontiers in Microbiology* 8, 1124.
- Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R and De A 2014. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One* 9, e96801.
- Verdonk JMAJ, Spreeuwenberg MAM, Bakker GCM and Verstegen MWA 2001. Nutrient intake level affects histology and permeability of the small intestine in newly weaned piglets. In *Digestive Physiology of Pigs* (ed. JE Lindberg and B Ogle), pp. 332–334. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Villena J, Aso H and Kitazawa H 2014. Regulation of toll-like receptors-mediated inflammation by immunobiotics in bovine intestinal epitheliocytes: role of signalling pathways and negative regulators. *Frontiers in Immunology* 5, 421.
- Yáñez-Ruiz DR, Abecia L and Newbold CJ 2015. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review. *Frontiers in Microbiology* 6, 1133.
- Zhang GL and Ghosh S 2002. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signalling by Tollip. *Journal of Biological Chemistry* 277, 7059–7065.



Capítulo II

Early feed restriction programs metabolic disorders in fattening merino lambs

Publicado en: *Animals*

Article

Early Feed Restriction Programs Metabolic Disorders in Fattening Merino Lambs

Javier Frutos ¹, Sonia Andrés ^{1,*}, Erminio Trevisi ² , David R. Yáñez-Ruiz ³, Secundino López ¹ , Alba Santos ¹ and Francisco Javier Giráldez ¹

¹ Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-Universidad de León, Finca Marzanas s/n, 24346 Grulleros, León, Spain; jdefrutos@igm.csic.es (J.F.); s.lopez@unileon.es (S.L.); alba.santos@igm.csic.es (A.S.); j.giraldez@eae.csic.es (F.J.G.)

² Faculty of Agriculture, Food and Environmental Science, Institute of Zootechnics, Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Emilia Parmense 84, 29122 Piacenza, Italy; erminio.trevisi@unicatt.it

³ Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain; david.yanez@eez.csic.es

* Correspondence: sonia.andres@eae.csic.es; Tel.: +34-987-317-156

Received: 9 May 2018; Accepted: 26 May 2018; Published: 31 May 2018



Simple Summary: Inadequate nutrition of lambs during early life may compromise their health status during their whole lifetime. The aim of this study was to investigate the long-term effects of milk restriction during the suckling period on biochemical, immunological, hepatic, and ruminal parameters of fattening lambs. The results obtained reveal that early feed restriction during the suckling period of merino lambs promotes systemic metabolic disorders during the fattening phase that are not related to ruminal acidosis occurrence. This information may contribute to design strategies to enhance the health status of lambs undergoing milk restriction due to low milk production (e.g., udder problems) or lack of lamb vitality.

Abstract: Early postnatal nutrition may have a significant subsequent impact on metabolic disorders during the entire lifespan of lambs. The aim of the present study was to describe the changes in biochemical, immunological, hepatic, and ruminal parameters of fattening lambs derived from early feed restriction during the suckling phase. Twenty-four merino lambs (average body weight, BW, 4.81 ± 0.256 kg) were used, 12 of them were milk-fed ad libitum (ADL) remaining permanently with their dams, whereas the other 12 lambs (restricted, RES) were subjected to milk restriction. After weaning, all the lambs were fed 35 g/kg BW per day of the same complete pelleted diet to ensure no differences between groups in dry matter intake (603 vs. 607 g/day for ADL and RES lambs, respectively, $p = 0.703$), and were slaughtered at a BW of 27 kg. Biochemical profiles revealed higher concentrations of ceruloplasmin and low-density lipoproteins, whereas insulin concentration was lower in the RES lambs compared to the ADL group. Liver thiobarbituric acid reactive substances were lower in the RES lambs. No significant differences in ruminal or blood immunological parameters were found. In conclusion, early feed restriction promoted metabolic disorders not related to ruminal acidosis occurrence, which can compromise the health status during the fattening period of merino lambs.

Keywords: metabolic syndrome; nutritional programming; inflammation; ruminal acidosis; feed efficiency; microbiota

1. Introduction

Exposure to undernutrition at early stages of development programs the major components of the metabolic syndrome (e.g., altered cholesterol metabolism, atherogenic dyslipidemia, endothelial

dysfunction), thus increasing the risk of cardiovascular disease in humans later in life [1]. This metabolic syndrome may also promote insulin resistance (and hence diabetes mellitus), visceral adiposity, obesity, and associated chronic low-grade inflammation with adverse long-term consequences on health status during the adult life [2]. Although there is information documenting these effects in humans, there are almost no studies describing the effects of early feed restriction on metabolic disorders in livestock species [3]. Filling this gap of knowledge is extremely important, since early feed restriction can take place during the suckling period under farm conditions for several reasons (e.g., reduction of milk production of the ewe or pathologies in the udder), which might compromise the health status of offspring later in life.

In ruminants, another important issue related to metabolic disorders is the microbiota firmly attached to the ruminal epithelium (epimural), since epithelial cells are fully competent for the recognition of microbial components and secretion factors modulating the inflammatory response [4,5]. Epimural microbiota may influence signaling pathways regulating the ruminal inflammatory response, such as cytokine production [6] or toll-like receptors (TLRs) in the membrane of several cell types (e.g., macrophages, T and B cells, or non-immune cells). Once established, the epimural bacterial community seems to be less influenced by the diet than microbiota associated to digesta [7–9]. Therefore, any factor (e.g., early feed restriction) modifying the composition of the epimural microbiota in the rumen might modulate the inflammatory response and hence the susceptibility of animals to the development of ruminal acidosis during the fattening phase, when non-optimal diet conditions are prevalent [6,8]. Decreasing the susceptibility to ruminal acidosis through the establishment of a healthy microbiota may improve animal welfare and performance. To our knowledge, there are no studies describing the effects of early feed restriction on ruminal epimural bacterial community and the subsequent implications for ruminal acidosis occurrence. Therefore, the effects of moderate early feed restriction on both systemic metabolic disorders and the ruminal status of fattening merino lambs after weaning were investigated in the current study.

2. Materials and Methods

The Animal Experimentation Committee of our research center (Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León)) authorized all of the handling practices included in the experimental design (protocol number 2015-04), which followed 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.

Twenty-four male lambs (merino breed) penned individually with their mother ewes during the suckling period were used in this experiment, as previously described by Santos et al. [10] and Frutos et al. [11]. The lambs were assigned randomly either to the ad libitum group (ADL, $n = 12$ lambs), in which each lamb remained all day (permanently) with the mother, or to the restricted group (RES, $n = 12$ lambs), where lambs were separated from the dams from 09:00 to 18:00 h every day. Dams of the RES group were injected with oxytocin to remove alveolar milk and then milked at 17:00 h before joining the lambs until the next day. Each lamb was weaned progressively starting at 13.5 kg body weight (BW). Weaned lambs weighing 15 kg of BW were penned individually, had free access to fresh drinking water, and were offered the same complete pelleted diet (CPD) at 35 g/kg BW per day throughout the fattening period to avoid differences in dry matter intake as explained elsewhere [10,12,13]. All the lambs received the CPD as a single daily meal at 09:00 h, and the amount of feed offered was adjusted twice a week based on the BW. Ingredients and chemical composition of CPD have been previously reported by Frutos et al. [11]. Finally, all the animals were slaughtered after a fattening period of at least 50 days when they reached the target BW of 27 kg, as explained previously by Santos et al. [10] and Frutos et al. [11].

2.1. Liver and Ruminant Parameters

A piece of liver was cut and kept at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined [14]. Samples of ruminal wall tissue from two locations (posterior part of dorsal sac and anterior part of ventral sac) were rinsed three times with sterile phosphate-buffered saline (PBS, pH = 7.0) to remove the digesta. Each sample was divided into several portions and preserved for analysis of ruminal epimural microbiota (stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h, then freeze-dried), gene expression of cytokines and toll-like receptors (stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), immunoglobulin A (IgA) quantification (stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), and histological examination (fixed by immersion in 10% buffered formalin for one week). Ruminal epimural microbiota was assayed by DNA extraction and quantitative real-time PCR (qPCR) according to Andrés et al. [15] and Vargas et al. [16]. Gene expression of cytokines and toll-like receptors was performed by RNA extraction of rumen samples and real-time quantitative reverse transcription PCR (RNAlater Invitrogen, Lithuania) according to Frutos et al. [11]. IgA quantification in serum and ruminal mucosa was determined according to Ahmed et al. [17]. Color and histological analysis of ruminal samples were performed as described by Álvarez-Rodríguez et al. [18].

2.2. Blood Sampling, Biochemical Profile Analysis, and Flow Cytometry

All the animals had blood samples taken three times during the experiment (suckling, pre-weaning, and fattening period) early in the morning. Blood samples were taken by jugular venipuncture into tubes containing either no anticoagulant or lithium-heparin. Tubes with no anticoagulant were allowed to clot in a water bath at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min and then centrifuged at $3520\times g$ for 16 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, and serum obtained was frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until used to determine IgA. Lithium-heparin tubes were placed in iced water and centrifuged at $3520\times g$ for 16 min at $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Plasma samples obtained were frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until used for ensuing determinations, as described elsewhere [19]. Inflammatory response tests included positive acute-phase proteins (haptoglobin and ceruloplasmin) and negative acute-phase proteins (albumin, paraoxanase, and vitamin A, as index of its carrier retinol binding protein). Total bilirubin, aspartate aminotransferase (AST) and gamma glutamyl transpeptidase (GGT) were the liver profile parameters. Plasmatic indices of energy status were glucose, non-esterified fatty acids (NEFA), β -hydroxybutyrate, cholesterol, low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), insulin, and triglycerides. The indicators of protein metabolism were urea, creatinine, total protein, and globulins. Assessment of oxidative stress and related variables included reactive oxygen metabolites (ROM), antioxidants (ferric reducing ability of plasma, FRAP), superoxide dismutase (SOD), vitamin E (α -tocopherol), and myeloperoxidase. Some minerals (Ca, Zn, Mg) were also determined in plasma. Haptoglobin, ceruloplasmin, albumin, paraoxanase, total bilirubin, AST, GGT, glucose, NEFA, β -hydroxybutyrate, total cholesterol, LDL, HDL, triglycerides, urea, creatinine, ROM, FRAP, SOD, myeloperoxidase, Ca, Zn, Mg, and total protein were determined by an autoanalyzer for biochemical chemistry ILAB 650 (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, USA). Globulin was calculated as the difference between total protein and albumin. Insulin, specific for sheep, was measured using an ELISA assay (Mercodia Ovine Insulin ELISA, Uppsala, Sweden) in microplates (Synergy 2, BioTek, Winooski, VT, USA). Plasma vitamins A and E were measured only during the fattening period by extraction with hexane and reverse-phase high-performance liquid chromatography using Spherisorb ODS-2, 3 m, in a $150\times 4.6\text{ mm}$ column (Alltech, Deerfield, IL, USA); an ultraviolet/visible detector set at 325 nm (for vitamin A) or 290 nm (for vitamin E); and 80:20 methanol:tetrahydrofurane as the mobile phase. Finally, during the fattening period, two more heparinized tubes were collected from each lamb in order to quantify lymphocyte population counts by flow cytometry according to Morán et al. [20].

2.3. Statistical Analysis

Data of liver TBARS values, color of ruminal papillae, histological measurements, plasma vitamins A and E, flow cytometry, IgA quantification, gene expression (TLRs and cytokines), and quantification

of microbiota were analyzed by one-way ANOVA using the general linear model (GLM) procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) with the dietary treatment (ADL or RES during the suckling period) as the only source of variation.

Data of biochemical parameters measured at several growth stages (suckling, pre-weaning, and fattening period) were analyzed as a repeated measures design using the MIXED procedure of SAS. Dietary treatment and growth stage were included in the model (the main effects of both factors and their interaction) as fixed effects. In all cases, the individual lamb was considered as the experimental unit and included in the model as a random effect. For each variable, the statistical model was fitted with competing covariance structures among the repeated measurements within a lamb (compound symmetric, unstructured, autoregressive, Toeplitz, and their heterogeneous versions) comparing the information criteria observed in each case. The covariance structure resulting in the smallest Akaike's and Bayesian information criteria was selected. The Tukey–Kramer multiple-comparison test was used to determine the significance of treatment effects (ADL vs. RES) within each time point (sucking, pre-weaning, and fattening period). Significance was declared at $p < 0.05$ and a tendency at $p < 0.10$.

3. Results

3.1. Biochemical Profile

The effects of early feed restriction on biochemical profile during the suckling, pre-weaning, and fattening periods are presented in Table 1. Insulin concentration was lower in RES lambs ($p = 0.034$), but whereas there was a significant difference between ADL and RES lambs during the sucking period (579 vs. 258 ng/L), the difference was not significant ($p > 0.05$) for the fattening phase (254 vs. 269 ng/L). The concentration of SOD in plasma, a parameter related to oxidative stress, was similar for both groups during the suckling period (0.63 vs. 0.64 U/L for ADL and RES lambs, respectively), and was significantly ($p < 0.05$) greater in RES (1.24 U/L) than in ADL (0.89 U/L) lambs for the fattening phase. Total cholesterol ($p = 0.020$) and plasma lipoproteins ($p = 0.046$ for LDL and $p = 0.039$ for HDL) were higher in early feed-restricted compared with ADL lambs. Ceruloplasmin (one of the positive inflammatory indicators) concentration in plasma was significantly ($p = 0.009$) greater and total bilirubin was lower ($p < 0.001$) in RES compared with ADL lambs. The rest of the parameters related to energy (e.g., NEFA, β -hydroxybutyrate, and glucose), protein metabolism (e.g., creatinine, AST, and urea), or inflammation (e.g., haptoglobin and paraoxonase) were not affected ($p > 0.05$) by early feed restriction.

Table 1. Biochemical parameters of fattening lambs fed ad libitum (ADL) or restricted (RES) diets during the suckling period.

	Treatment		Growth Stage			SED ₁	SED ₂	p-Values		
	ADL	RES	SCK	PWN	FTT			T	GS	T*GS
Haptoglobin (g/L)	0.22	0.23	0.21 ^A	0.20 ^A	0.27 ^B	0.022	0.025	0.886	0.016	0.470
Ceruloplasmin (μ mol/L)	2.34 ^A	3.10 ^B	2.81	2.80	2.55	0.262	0.222	0.009	0.427	0.308
β -hydroxybutyrate (mmol/L)	0.29	0.31	0.30	0.27	0.32	0.027	0.033	0.495	0.393	0.316
Paraoxonase (U/L)	117	125	88 ^A	150 ^C	125 ^B	15.0	7.63	0.624	<0.001	0.018
ROM (mg/100 mL)	16.5	17.6	17.0	17.9	16.2	1.22	1.04	0.382	0.276	0.020
Myeloperoxidase (U/L)	434	466	400 ^A	417 ^A	533 ^B	52.1	49.8	0.554	0.021	0.848
FRAP (μ mol/L)	154	154	147	152	164	10.3	12.6	0.945	0.400	0.207
SOD (U/L)	0.69 ^A	1.04 ^B	0.64 ^A	0.89 ^B	1.07 ^B	0.077	0.094	<0.001	<0.001	0.043
Ca (mmol/L)	3.02	2.96	3.16 ^B	3.09 ^B	2.73 ^A	0.044	0.043	0.174	<0.001	0.200
Mg (mmol/L)	0.92	0.90	0.86 ^A	0.87 ^A	0.99 ^B	0.022	0.016	0.557	<0.001	0.461
Zn (mmol/L)	15.8	16.5	18.9 ^C	16.0 ^B	13.6 ^A	0.959	1.174	0.481	<0.001	0.196
Retinol (μ g/100 mL)	40.2	39.9				3.43		0.935		
Tocopherol (μ g/mL)	0.23	0.23				0.016		0.867		

Table 1. Cont.

	Treatment		Growth Stage			SED ₁	SED ₂	p-Values		
	ADL	RES	SCK	PWN	FTT			T	GS	T*GS
AST (U/L)	146	162	73 ^A	87 ^A	301 ^B	36.13	44.25	0.656	<0.001	0.763
GGT (U/L)	126	102	210 ^B	69 ^A	63 ^A	22.91	27.12	0.298	<0.001	0.271
Total bilirubin (µmol/L)	2.10 ^B	0.93 ^A	2.73 ^B	1.06 ^A	0.76 ^A	0.314	0.3770	<0.001	<0.001	0.661
Creatinine (µmol/L)	63.5	63.7	57.5 ^A	65.2 ^B	68.1 ^C	1.73	1.113	0.937	<0.001	0.385
Glucose (mmol/L)	6.66	6.31	7.47 ^B	6.76 ^B	5.22 ^A	0.212	0.164	0.109	<0.001	0.675
Insulin (ng/L)	497 ^B	289 ^A	418 ^B	499 ^B	262 ^A	92.2	106.8	0.034	0.008	0.025
Urea (mmol/L)	6.89	7.45	4.59 ^A	6.09 ^B	10.84 ^C	0.37	0.36	0.143	<0.001	0.009
Protein (g/L)	63.3	63.3	62.9	63.3	63.7	1.29	1.21	0.978	0.816	0.423
Albumin (g/L)	34.8	34.7	33.4 ^A	35.5 ^B	35.3 ^B	0.41	0.42	0.947	<0.001	0.706
Globulin (g/L)	28.6	28.6	29.5	27.8	28.4	1.23	1.37	0.995	0.440	0.420
Cholesterol (mmol/L)	2.06 ^A	2.50 ^B	3.08 ^B	2.72 ^B	1.05 ^A	0.173	0.193	0.020	<0.001	0.497
LDL (mmol/L)	0.56 ^A	0.72 ^B	0.88 ^C	0.73 ^B	0.32 ^A	0.076	0.750	0.046	<0.001	0.746
HDL (mmol/L)	1.10 ^A	1.33 ^B	1.67 ^B	1.50 ^B	0.48 ^A	0.103	0.107	0.039	<0.001	0.392
NEFA (g/L)	0.43	0.44	0.63 ^C	0.53 ^B	0.14 ^A	0.042	0.44	0.755	<0.001	0.639
Triglycerides (mmol/L)	0.53	0.54	0.75 ^B	0.68 ^B	0.18 ^A	0.060	0.072	0.872	<0.001	0.977

^{A,B,C} Values within a row with different superscripts differ significantly at $p < 0.05$ for dietary treatment or growth stage. AST, aspartate transaminase; FRAP, ferric reducing ability of plasma; FTT, fattening period; GGT, gamma-glutamyltransferase; GS, growth stage; HDL, high-density lipoproteins; LDL, low-density lipoproteins; NEFA, non-esterified fatty acids; PW, pre-weaning period; ROM, reactive oxygen metabolites; SCK, suckling period; SED₁, standard error of the difference to compare dietary treatments; SED₂, standard error of the difference to compare growth stage; SOD, superoxide dismutase; T, dietary treatment; T*GS, interaction between dietary treatment and growth stage.

3.2. Immunological Parameters

No significant differences between experimental groups were observed in blood lymphocyte populations (flow cytometry) or IgA concentration in plasma and ruminal mucosa (Table 2). There were no significant effects of early feed restriction on mRNA expression of interferon gamma (IFN- γ), transforming growth factor β (TGF- β), or TLRs in ruminal mucosa (Table 3).

Table 2. Lymphocyte counts measured by flow cytometry in peripheral blood, ruminal parameters, and immunoglobulin A (IgA) concentration in serum and ruminal mucosa of fattening lambs being fed ad libitum (ADL) or restricted (RES) diets during the suckling period.

	ADL	RES	RSD	p-Value
Lymphocytes (%)¹				
CD4 ⁺	9.29	12.2	7.4	0.351
CD8 ⁺	4.83	5.26	3.69	0.779
CD45 ⁺	17.5	19.5	10.4	0.649
CD21 ⁺	21.8	21.9	14.0	0.719
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.79	2.32	1.51	0.403
Ruminal parameters				
Mean gray value ²	130	126	8.5	0.297
Papillae length AV (µm)	3985	3649	856	0.359
Papillae length PD (µm)	3878	3874	893	0.993
Papillae width AV (µm)	1244	1178	177	0.383
Papillae width PD (µm)	1289	1318	220	0.771
Stratum corneum thickness AV (µm)	61.3	59.1	13.6	0.690
Stratum corneum thickness PD (µm)	60.2	70.6	19.8	0.208
IgA				
Blood (pg/mL)	7921	8981	2595	0.373
Rumen (pg/µg total protein)	5.87	4.51	3.52	0.413

¹ Percentage of positive stained cells in sample populations of 10,000 individual cells. ² Colour of ruminal mucosa, from a scale where 0 is black and 256 white. AV, anterior part of ventral sac; MDA, malonaldehyde; PD, posterior part of dorsal sac; RSD, residual standard deviation.

Table 3. Cytokines and toll-like receptors (TLRs) mRNA expression in ruminal mucosa of fattening lambs being fed ad libitum (ADL) or restricted (RES) diets during the suckling period.

	ADL	RES	RSD	<i>p</i> -Value
Cytokines (ΔCq)¹				
IFN- γ	11.3	11.2	1.6	0.927
TGF- β	6.32	6.52	0.65	0.558
TLR (ΔCq)¹				
TLR ₁	11.3	11.9	0.8	0.072
TLR ₂	23.6	23.5	1.9	0.903
TLR ₃	14.8	15.4	0.8	0.056
TLR ₄	12.2	12.4	0.7	0.521
TLR ₅	23.7	23.6	1.7	0.870
TLR ₆	11.7	12.1	1.0	0.364
TLR ₇	15.2	15.7	0.9	0.212
TLR ₈	18.0	17.8	0.8	0.577
TLR ₉	16.9	17.0	1.4	0.957
TLR ₁₀	14.0	13.9	1.3	0.938

¹ Cq, quantification cycle. Δ Cq = Cq (cytokines or TLRs) – Cq (β -actin). Lower Cq represents higher mRNA abundance level. IFN- γ , interferon gamma; RSD, residual standard deviation; TGF- β , transforming growth factor beta.

3.3. Liver Antioxidant Status (TBARS), Ruminal Characteristics, and Epimural Microbiota

The liver TBARS concentrations (inversely correlated to the antioxidant status) were significantly higher in ADL than in RES lambs (5.17 vs. 3.22 μ g malonaldehyde (MDA)/g sample, RSD = 1.53, $p = 0.005$).

No significant differences were observed between treatments in color, height, or width of ruminal papillae, or thickness of stratum corneum (Table 2). The amount of total bacteria and the relative abundance (quantified by qPCR) of the microbial groups examined in the rumen (e.g., *Prevotella* spp., *Selenomonas ruminantium*, and methanogens) was not significantly affected by treatment (Figure 1).

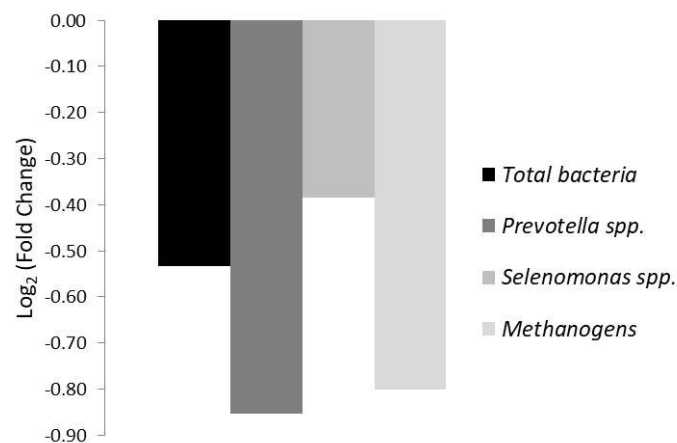


Figure 1. Relative quantitation compared to lambs fed ad libitum (ADL) of 16S rRNA copy numbers of microbial groups attached to the ruminal mucosa after early feed restriction (RES) during the suckling period. Fold-changes for specific amplicon groups were calculated as the log₂ ratio of normalized abundances. No significant differences in copy number ($p > 0.05$, Tukey's method of SAS) were observed between groups.

4. Discussion

Early feed restriction can program metabolic risk and the development of pathological processes later in life [2,21], and can also influence the colonization of ruminal mucosa by commensal bacteria

and, consequently, the inflammatory response [22]. Therefore, the possible consequences of moderate early feed restriction in suckling lambs for the occurrence of systemic and/or ruminal metabolic disorders were investigated comprehensively in this study.

Inadequate nutrient intake leads to a condition of negative energy balance and mobilization of lipids, thus increasing NEFA concentration and suppressing important immune functions [23,24]. However, the lack of differences in NEFA and immunity parameters such as blood lymphocytes (flow cytometry) or serum IgA suggest that RES lambs did not suffer a severe undernutrition or an adverse effect on their immune system. The moderate early feed restriction undergone by the RES lambs impaired β -oxidation of fatty acids [12] and promoted fat accumulation in the liver, carcass, and intramuscular depots [10,13], which would explain the lower liver TBARS values observed in these animals.

Early moderate feed restriction reduces insulin secretion and modifies insulin sensitivity in a tissue-specific manner in order to ensure enough glucose uptake by fundamental organs such as brain and heart during early life [2,21,25]. This adaptation mechanism during the feed-restriction period, together with the lower levels of bilirubin [26], might have induced insulin resistance so that more insulin (not detected probably because sampling was early in the morning before delivery of CPD) would be required to metabolize glucose during the fattening phase of RES lambs. Insulin is a lipogenic hormone, explaining the greater fat accumulation observed in the RES group [10,13]. Therefore, the observations of the present study support a metabolic syndrome induced in the RES lambs by early feed restriction, which might have been at least partly responsible for the lower feed efficiency traits in this group of lambs, as previously published by Santos et al. [13].

In line with the previous statement, the higher levels of ceruloplasmin (a positive acute-phase protein) observed for the RES lambs suggest a possible detrimental effect on health/metabolic status of these animals during the fattening period. This parameter, together with the lower levels of total bilirubin (with antioxidant properties; [27]) and higher values of SOD (with ROM reduction capability and anti-inflammatory properties), suggest a persisting inflammatory condition promoted by early feed restriction in RES lambs [23], as previously reported in the ileum [11]. This seems to be corroborated by the significantly higher cholesterol levels observed in the RES lambs when compared to the ADL group (probably enhanced by the lower plasmatic bilirubin concentration of RES lambs [26]), because the higher cholesterol concentration may promote inflammatory responses in different species [28]. The activity of enzymes involved in cholesterol synthesis and excretion may be programmed during early life (e.g., by feed restriction), thus affecting lipid metabolism and inflammatory profile later in life [1,2].

The lack of changes in the total bacteria or other microbial groups attached to the ruminal epithelium indicates no impact of moderate early feed restriction on the colonization of ruminal mucosa [29]. This circumstance, together with the lack of differences in ruminal fermentation parameters [13] and the identical morphometric and color parameters of the ruminal mucosa, suggest no differences in ruminal acidosis incidence promoted by early feed restriction despite of the differences in cholesterol [30]. The absence of significant differences in the gene expression of both TLRs (key inducers of inflammation probably through NF- κ B activation) and cytokines in the ruminal wall also seems to corroborate this situation.

5. Conclusions

Moderate early feed restriction during the suckling period of merino lambs promotes metabolic alterations during the fattening phase, mainly related to lipid metabolism and adiposity. This event, which might impair health status, is independent of ruminal acidosis occurrence during the fattening period.

Author Contributions: J.F. and A.S. performed the in vivo trial and the analyses of samples; S.A. wrote the draft; E.T. was responsible for the analyses of biochemical parameters and contributed to the interpretation of these data; D.R.Y.-R. analyzed TLR and cytokines and contributed to the interpretation of these data; F.J.G. and S.L.

were responsible for the statistical analysis and were major contributors in revising the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding: Ministerio de Economía y Competitividad: AGL2014-54124R. Consejo Superior de Investigaciones Científicas: 201540E084. Ministerio de Educación, Cultura y Deporte: FPU15/01630.

Acknowledgments: This work was supported by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO, AGL2014-54124R). We would also like to thank MINECO (BFU2014-57964-R) for TLR quantification, CSIC (Proyecto Intramural Especial; Project 201540E084) and University of León (Ayudas Puente Formativas) for supporting J. Frutos. Alba Santos gratefully acknowledges the receipt of a pre-doctoral grant from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (MECD, FPU15/01630). The authors gratefully thank Julio Benavides for providing histological sections of rumen samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Barker, D.J.P.; Martyn, C.N.; Osmond, C.; Hales, C.N.; Fall, C.H.D. Growth in-utero and serum-cholesterol concentrations in adult life. *BMJ* **1993**, *307*, 1524–1527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Lizárraga-Mollinedo, E.; Fernández-Millán, E.; García-San Frutos, M.; de Toro-Martín, J.; Fernández-Agulló, T.; Ros, M.; Álvarez, C.; Escrivá, F. Early and long-term undernutrition in female rats exacerbates the metabolic risk associated with nutritional rehabilitation. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 19353–19366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. 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. Programming of glucose-insulin metabolism in adult sheep after maternal undernutrition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2005**, *289*, R947–R954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Nagaraja, T.G.; Titgemeyer, E.C. Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, E17–E38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Malmuthuge, N.; Li, M.; Fries, P.; Griebel, P.J.; Guan, L.L. Regional and age dependent changes in gene expression of toll-like receptors and key antimicrobial defence molecules throughout the gastrointestinal tract of dairy calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2012**, *146*, 18–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Trevisi, E.; Amadori, M.; Riva, F.; Bertoni, G.; Bani, P. Evaluation of innate immune responses in bovine forestomachs. *Res. Vet. Sci.* **2014**, *96*, 69–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Petri, R.M.; Schwaiger, T.; Penner, G.B.; Beauchemin, K.A.; Forster, R.J.; McKinnon, J.J.; McAllister, T.A. Changes in the rumen epimural bacterial diversity of beef cattle as affected by diet and induced ruminal acidosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 3744–3755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Yáñez-Ruiz, D.R.; Abecia, L.; Newbold, C.J. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: A review. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Meale, S.J.; Li, S.; Azevedo, P.; Derakhshani, H.; Plaizier, J.C.; Khafipour, E.; Steele, M.A. Development of ruminal and fecal microbiomes are affected by weaning but not weaning strategy in dairy calves. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Santos, A.; Giráldez, F.J.; Mateo, J.; Frutos, J.; Andrés, S. 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.* **2018**, *135*, 20–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Frutos, J.; Andrés, S.; Yáñez-Ruiz, D.R.; Benavides, J.; López, S.; Santos, A.; Martínez-Valladares, M.; Rozada, F.; Giráldez, F.J. Early feed restriction of lambs modifies ileal epimural microbiota and affects immunity parameters during the fattening period. *Animal* **2018**, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Santos, A.; Giráldez, F.J.; Trevisi, E.; Lucini, L.; Frutos, J.; Andrés, S. Liver transcriptomic and plasma metabolomic profiles of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period. *J. Anim. Sci.* **2018**, *96*, 1495–1507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Santos, A.; Valdés, C.; Giráldez, F.J.; López, S.; France, J.; Frutos, J.; Fernández, M.; Andrés, S. Feed efficiency and the liver proteome of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period. *Animal* **2018**, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bodas, R.; Prieto, N.; Jordán, M.J.; López-Campos, O.; Giráldez, F.J.; Morán, L.; Andrés, S. The liver antioxidant status of fattening lambs is improved by naringin dietary supplementation at 0.15% rates but not meat quality. *Animal* **2012**, *6*, 863–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Andrés, S.; Bodas, R.; Tejido, M.L.; Giráldez, F.J.; Valdés, C.; López, S. Effects of the inclusion of flaxseed and quercetin in the diet of fattening lambs on ruminal microbiota, in vitro fermentation and biohydrogenation of fatty acids. *J. Agric. Sci.* **2016**, *154*, 542–552. [[CrossRef](#)]
16. Vargas, J.E.; Andrés, S.; Snelling, T.J.; López-Ferreras, L.; Yáñez-Ruiz, D.R.; García-Estrada, C.; López, S. Effect of sunflower and marine oils on ruminal microbiota, in vitro fermentation and digesta fatty acid profile. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ahmed, A.M.; Sebastiano, S.R.; Sweeney, T.; Hanrahan, J.P.; Glynn, A.; Keane, O.M.; Mukhopadhyaya, A.; Thornton, K.; Good, B. Breed differences in humoral and cellular responses of lambs to experimental infection with the gastrointestinal nematode *teladorsagia circumcincta*. *Vet. Res.* **2015**, *46*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Álvarez-Rodríguez, J.; Monleón, E.; Sanz, A.; Badiola, J.J.; Joy, M. Rumen fermentation and histology in light lambs as affected by forage supply and lactation length. *Res. Vet. Sci.* **2012**, *92*, 247–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Jacometo, C.B.; Osorio, J.S.; Socha, M.; Correa, M.N.; Piccioli-Cappelli, F.; Trevisi, E.; Loor, J.J. Maternal consumption of organic trace minerals alters calf systemic and neutrophil mRNA and microRNA indicators of inflammation and oxidative stress. *J. Dairy Sci.* **2015**, *98*, 7717–7729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Morán, L.; Andrés, S.; Bodas, R.; Benavides, J.; Prieto, N.; Pérez, V.; Giráldez, F.J. Antioxidants included in the diet of fattening lambs: Effects on immune response, stress, welfare and distal gut microbiota. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2012**, *173*, 177–185. [[CrossRef](#)]
21. Greenwood, P.L.; Hunt, A.S.; Slepetic, R.M.; Finnerty, K.D.; Alston, C.; Beermann, D.H.; Bell, A.W. Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: III. Regulation of energy metabolism. *J. Anim. Sci.* **2002**, *80*, 2850–2861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Taschuk, R.; Griebel, P.J. Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract. *Anim. Health Res. Rev.* **2012**, *13*, 129–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Trevisi, E.; Amadori, M.; Cogrossi, S.; Razzuoli, E.; Bertoni, G. Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Res. Vet. Sci.* **2012**, *93*, 695–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Viñoles, C.; De Barbieri, I.; Gil, J.; Olivera, J.; Fierro, S.; Bialade, F.; Montossi, F. Long-term effect of nutrition on the metabolic status and reproductive potential of merino rams under grazing conditions. *Anim. Prod. Sci.* **2012**, *52*, 881–889. [[CrossRef](#)]
25. Nurliyana, A.R.; Shariff, Z.M.; Taib, M.N.M.; Gan, W.Y.; Tan, K.A. Early nutrition, growth and cognitive development of infants from birth to 2 years in malaysia: A study protocol. *BMC Pediatr.* **2016**, *16*, 160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Liu, J.; Dong, H.; Zhang, Y.; Cao, M.; Song, L.; Pan, Q.; Bulmer, A.; Adams, D.B.; Dong, X.; Wang, H. Bilirubin increases insulin sensitivity by regulating cholesterol metabolism, adipokines and PPAR γ levels. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Jansen, T.; Daiber, A. Direct antioxidant properties of bilirubin and biliverdin. Is there a role for biliverdin reductase? *Front. Pharmacol.* **2012**, *3*, 30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Tall, A.R.; Yvan-Charvet, L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 104–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Steele, M.A.; AlZahal, O.; Hook, S.E.; Croom, J.; McBride, B.W. Ruminal acidosis and the rapid onset of ruminal parakeratosis in a mature dairy cow: A case report. *Acta Vet. Scand.* **2009**, *51*, 39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Khiaosa-ard, R.; Pourazad, P.; Aditya, S.; Humer, E.; Zebeli, Q. Factors related to variation in the susceptibility to subacute ruminal acidosis in early lactating simmental cows fed the same grain-rich diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2018**, *238*, 111–122. [[CrossRef](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Capítulo III

Feed restriction in early life modifies the colonic epimural bacterial community and feed efficiency traits during the fattening period of merino lambs

J. Frutos*, S. Andrés*, D.R. Yáñez-Ruiz**, A. Santos*, J. Benavides*, N. Santos*, F.J. Giráldez*

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

**Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda, 1, 18008 Granada (Spain)

En proceso de publicación en *Options Méditerranéennes*

Abstract

Bacteria firmly attached to the gastrointestinal epithelium during early life show a significant impact on nutrient processing, immune-stimulation, health and feed efficiency traits during the entire life of lambs. Thus, the aim of the present study was to describe the changes in the colonic epimural bacterial community of fattening lambs promoted by different levels of nutrition during the suckling phase trying to shed some light on the underlying mechanisms behind different feed efficiency traits. Twenty-four merino lambs (average live body weight, LBW, 4.81 ± 0.256 kg) were used, twelve of them (*ad libitum*, ADL) being kept permanently with the dams whereas the other group (restricted, RES) was separated periodically from the dams and milk restricted. After weaning all the animals were penned individually, offered the same complete pelleted diet at a restricted level (35 g/kg LBW to ensure no differences of dry matter intake) and slaughtered with a target body weight of 27 kg. During the fattening period, lower gain:feed ratio (0.320 vs. 0.261, $P < 0.001$) was observed for the RES group. Additionally, an increment of *Prevotella sp.* was detected in the colonic epimural bacterial community of RES ($P = 0.052$), whereas *Proteobacteria* was decreased ($P < 0.05$). However, the colonic gene expression of toll-like receptors (ΔCq), immunohistochemistry parameters (counts of lymphocytes T, B) and IgA levels (pg IgA/ μ g total protein) were not modified. In conclusion, the level of nutrition during the suckling phase promoted changes in feed efficiency traits and colonic epimural bacterial community that were not related to the immune response at this level.

Keywords: feed efficiency, lambs, colon, microbiota, immunity

Introduction

The Animal Task Force (2013) has identified improving animal feed efficiency and understanding of the interactions between nutrition, microbiome and immunity in the gut as priorities of research under the Horizon2020 strategy.

The epithelium of the gastrointestinal tract (GIT) is involved in a major part of the immune system and it is well-known that colonization of gut mucosal surfaces can be modulated by nutritional interventions during early life (Taschuk and Griebel, 2012). Moreover, once established, microbiota firmly attached to the GIT mucosa (epimural) seems to be more stable than that associated with GIT contents (Petri et al., 2013). Thus, manipulating epimural bacterial community in the first stages of life by nutritional management could promote long-term effects on immune response and/or the efficiency of utilization of nutrients along the whole life of the animals.

The aim of the present study was to assess whether bacterial colonization of colon mucosa is modified by the level of nutrition during the suckling period of merino lambs, hence promoting long-term effects on feed efficiency traits and colonic immune parameters during the fattening period.

Material and methods

Twenty-four male merino lambs were used in the experiment. The lambs were stratified on the basis of live body weight at birth (average LBW 4.81 ± 0.256 kg), and then assigned randomly to one of two experimental treatments (n=12 per dietary treatment) during the suckling phase. The first group (*ad libitum*, ADL) was kept permanently with the dams, whereas the other (restricted,

RES) was separated from the sheep from 9 to 18 h (dams were milked at 17 h and injected with oxytocin to remove alveolar milk). When lambs reached 13.5 kg of LBW they were weaned progressively until they weighed 15 kg. Then, all the animals were penned individually and offered the same complete pelleted diet (CPD) at a restricted level (35 g/kg LBW each day) to avoid differences in dry matter intake (DMI). After a fattening period of at least 50 days, all the animals were slaughtered with a target LBW of 27 kg. Colon tissue samples were collected for microbiological analysis (stored at -80 °C during 48 h, then freeze-died), gene expression (RNAlater Invitrogen, Lithuania; stored at -80 °C), IgA quantification (stored at -20 °C) and immunohistochemistry examination (fixed by immersion in 10% buffered formalin for one week).

The luminal part of the freeze-died colon samples was scraped and microbial DNA purification was performed with the UltraClean Tissue & Cells DNA Isolation Kit Sample (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA). Samples of microbial DNA were used as templates for T-RFLP analysis according to Andrés et al. (2016), but using MspI as restriction enzyme.

Total RNA was extracted from samples and reversed transcribed using QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The RNA was used as template for qRT-PCR analysis to evaluate the expression of genes encoding 10 bovine toll-like receptors (TLRs), β -defensin and PGLYRP1 in the epithelium using the gene specific primer pairs relative to β -actin expression.

IgA was quantified in colonic mucosa according to the procedure described by Ahmed et al. (2015), using a Genorise ELISA IgA kit (Genorise Scientific, Devon-Berwyn, PA, USA).

Immunohistochemical labelling of T (anti-CD3 antibody; Dako, Milan, Italy) and B cells (anti-CD20 antibody; ThermoFisher, Madrid, Spain) was carried out with cross sections of the colonic wall samples. Quantification was performed in ten random fields within the lamina propria with final magnification of 40 \times , using image analysis software (ImageJ v1.6.0_14, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Data were analyzed using GLM procedure (one-way analysis of variance) of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), with the milk intake level as the only source of variation. Significance was declared at $P < 0.05$. Those data corresponding to T-RFLP were analyzed by principal component analysis (PCA).

Results and discussion

Gastrointestinal mucosa is colonized after birth by pioneer microbes and colonization may be manipulated by early feeding management. Once epimural bacterial population is established, it may deeply impact health, feed efficiency and immune response in later stages of life (Taschuk and Griebel, 2012; Petri et al., 2013).

The group that was milk restricted showed a lower gain:feed ratio during the fattening period (0.320 vs. 0.261, $P < 0.001$), being DMI similar for both groups (603 vs. 607 g/day, $P > 0.005$). Consequently, RES lambs lasted more time during this period (62 vs. 74 days, $P < 0.001$) to reach the intended body weight of slaughter (27 kg of LBW).

Moreover, the different level of milk intake during the suckling period might explain the clusters observed for the ADL and RES groups when the relative height of terminal restriction fragments (TRF) was analyzed by PCA. An increase of genus *Prevotella* (TRF 99 pb; 0.26% vs 1.17% in the ADL and RES lambs, respectively, $P = 0.052$) and a lower abundance of phylum *Proteobacteria* (TRF 140 pb, 11.17% vs 1.89%, $P = 0.003$; and TRF 152 pb, 2.19% vs. 0.47%, $P =$

0.008) were observed in the colonic mucosa of RES lambs when compared to the ADL group. In accordance with these results, *Prevotella* is a genus commonly found in the large intestine which has been reported in greater abundance in the ruminal liquid of inefficient (high Residual Feed Intake, RFI +) bulls (McCann et al., 2014) and within the colon content from steers differing in feed efficiency traits (Myer et al., 2015). In addition, *Proteobacteria* is a prevalent phylum in the GIT involved in nutrient digestion that has been previously described in lower relative abundance in the jejunum of low efficient steers (Myer et al., 2016).

Nevertheless, the colonic mRNA expression of TLRs, number of lymphocytes T and B infiltrated in the lamina propria, and IgA levels were not affected by the different suckling regime ($P > 0.005$) (Table 1). Thus, the aforementioned changes in the colonic epimural bacterial community between RES and ADL lambs did not seem to promote significant differences in the immune parameters analyzed at this level.

Table 1. Toll-like receptors (TLRs) mRNA expression, IgA concentration in colonic mucosa and infiltrating lymphocyte counts in colonic lamina propria of fattening lambs being fed *ad libitum* (ADL) or restricted (RES) during the suckling period.

	ADL	RES	RSD	P-value
TLR (ΔCq)				
TLR ₁	12.5	12.2	2.03	0.792
TLR ₂	20.9	19.2	4.97	0.540
TLR ₃	13.1	13.6	2.11	0.681
TLR ₄	10.7	10.4	1.73	0.763
TLR ₅	21.3	20.8	3.04	0.784
TLR ₆	10.1	9.82	2.02	0.789
TLR ₇	14.3	14.3	2.68	0.992
TLR ₈	10.7	11.1	1.94	0.676
TLR ₉	15.5	15.9	1.27	0.522
TLR ₁₀	14.9	15.6	2.18	0.562
IgA (pg IgA/ μ g total protein)	27.6	26.6	2.36	0.394
Lymphocytes (number per field 40 \times)				
B ⁺	3.50	3.84	1.272	0.522
T ⁺	138	159	33.34	0.181

¹ Cq = quantification cycle. $\Delta Cq = Cq(\text{TLR}) - Cq(\beta\text{-actin})$. A smaller ΔCq value represents higher mRNA abundance level.

Conclusions

The results of the present study suggest that early feed restriction during the suckling phase of merino lambs affected feed efficiency and promoted differences in the establishment of the colonic epimural bacterial community, with increased relative abundance of genus *Prevotella* and decreased presence of phylum *Proteobacteria* in milk restricted lambs. However, these modifications could not be associated with differences at local immune response.

References

- Ahmed AM, Sebastiano SR, Sweeney T, Hanrahan JP, Glynn A, Keane OM, Mukhopadhyaya A, Thornton K, Good B, 2015. Breed differences in humoral and cellular responses of lambs to experimental infection with the gastrointestinal nematode *Teladorsagia circumcincta*. In: *Vet Res*, 46:8.
- Andrés S, Bodas R, Tejido ML, Giráldez FJ, Valdés C, López S, 2016. Effects of the inclusion of flaxseed and quercetin in the diet of fattening lambs on ruminal microbiota, in vitro fermentation and biohydrogenation of fatty acids. In: *J Agri Sci*, 154, p. 542–552.
- Animal Task Force, 2013. Research & innovation for a sustainable livestock sector in Europe. [Online]. Available: <http://www.animaltaskforce.eu/Portals/0/ATF/horizon2020/ATF%20white%20paper%20Research%20priorities%20for%20a%20sustainable%20livestock%20sector%20in%20Europe.pdf> [Accessed 12/02/2019].
- McCann JC, Wiley LM, Forbes TD, Rouquette Jr FM, Tedeschi LO, 2014. Relationship between the rumen microbiome and residual feed intake-efficiency of brahman bulls stocked on bermudagrass pastures. In: *PLoS One*, 9:e91864.
- Myer PR, Wells JE, Smith TPL, Kuehn LA, Freetly HC, 2015. Microbial community profiles of the colon from steers differing in feed efficiency. In: *SpringerPlus*, 4:454.
- Myer PR, Wells JE, Smith TPL, Kuehn LA, Freetly HC, 2016. Microbial community profiles of the jejunum from steers differing in feed efficiency. In: *J Anim Sci*, 94, p. 327–338.
- Petri RM, Schwaiger T, Penner GB, Beauchemin KA, Forster RJ, McKinnon JJ, and McAllister TA, 2013. Changes in the rumen epimural bacterial diversity of beef cattle as affected by diet and induced ruminal acidosis. In: *Appl Environ Microbiol*, 79, p. 3744-3755.
- Taschuk R, Griebel PJ, 2012. Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract. In: *Anim Health Res*, 13, p. 129–141.

Capítulo IV

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

Publicado en: Animal Feed Science and Technology



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

J. Frutos^a, S. Andrés^{a,*}, E. Trevisi^b, J. Benavides^a, N. Santos^a, A. Santos^a, F.J. Giráldez^a

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

^b Department of Animal Sciences, Food and Nutrition (DIANA), Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Emilia Parmense 84, 29122, Piacenza, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Feed restriction
Metabolic programming
Feed efficiency
Inflammation
Microbiome
GALT

ABSTRACT

Undernutrition during the first stages of life may impair maturation of the immune system, harming the health status permanently. Thus, the aim of the present study was to define the impact of moderated milk replacer (MR) restriction during the artificial rearing period on the gut-associated lymphoid tissues of pre-weaned ewe lambs and long-term effects on biochemical profile and animal performance during the replacement period. Forty female Assaf lambs [average live body weight (LBW) 4.73 ± 0.116 kg] were penned individually. The first group of lambs ($n = 20$) was fed MR *ad libitum* (ADL) whereas the second one (restricted, RES; $n = 20$) only received approximately 62.5% of the MR intake measured in the ADL group. All the lambs were weighed twice a week until they were 35-days-old. Then, 8 lambs from each group (pre-weaned) were harvested and ileal samples collected. The rest of the lambs (12 ADL vs. 12 RES) were weaned progressively, and then offered a total mixed ration (TMR) *ad libitum* until the end of the experiment (7.5-months-old). The lower nutrient intake of RES pre-weaned lambs caused greater percentages for T lymphocytes ($CD4^+$, $CD8^+$, $WC1^+$) and an increased secretory immunoglobulin A (sIgA) production in the ileum compared to the ADL group ($P < 0.05$). These results, together with the significant differences in the expression of toll-like receptors and cytokines at this level (e.g., interferon gamma was increased in the RES group; $P < 0.05$) suggest the existence of pro-inflammatory conditions in the ileum of pre-weaned lambs promoted by early feed restriction. Moreover, the biochemical profile revealed that liver function (e.g., albumin, gamma glutamyl transpeptidase) was impaired during several months once the feed restriction period was finished, whereas the average daily gain during the replacement phase was reduced for the early feed restricted lambs (182 vs. 202 g/day for RES and ADL groups, respectively; $P < 0.05$). Therefore it can be concluded that moderated MR restriction promoted

Abbreviations: ADL, *ad libitum*; AST, aspartate aminotransferase; BHB, beta-hydroxybutyrate; Cq, quantification cycle; FRAP, ferric reducing ability of plasma; GALT, gut-associated lymphoid tissue; GGT, gamma glutamyl transpeptidase; HDL, high-density lipoprotein; IFN- γ , interferon gamma; IL, interleukin; iPP, ileal Peyer's patches; LBW, live body weight; LDL, low-density lipoprotein; MR, milk replacer; NEFA, non-esterified fatty acids; PEM, protein-energy malnutrition; PON, paraoxonase; RES, restricted; ROM, reactive oxygen metabolites; SED, standard error of the difference; sIgA, secretory immunoglobulin A; SOD, superoxide dismutase; TGF- β , transforming growth factor beta; TLRs, toll-like receptors; TMR, total mixed ration

* Corresponding author.

E-mail addresses: jdefrutos@igm.csic.es (J. Frutos), sonia.andres@eae.csic.es (S. Andrés), erminio.trevisi@unicatt.it (E. Trevisi), julio.benavides.silvan@csic.es (J. Benavides), n.santos@csic.es (N. Santos), alba.santos@igm.csic.es (A. Santos), j.giraldez@eae.csic.es (F.J. Giráldez).

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.07.009>

Received 28 April 2018; Received in revised form 5 July 2018; Accepted 8 July 2018
0377-8401/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

both, pro-inflammatory conditions at ileal level in the pre-weaned lambs and an altered liver function which lasted several months after the end of feed restriction. Both circumstances might have impaired animal performance during the replacement phase of the ewe lambs.

1. Introduction

Nutrition is a critical determinant of immune response, so a deficient supply of nutrients may influence cell-mediated immunity, cytokine production, the complement system, phagocytic functions and secretory immunoglobulin A (sIgA) concentrations in humans according to the review reported by Chandra (1997). These effects can be worsened if feed restriction takes place during early life, because the lack of nutrients may impair not only animal growth, but also the adequate development of the gut-associated lymphoid tissue (GALT), thus having negative consequences on the health status along the whole life. Moreover, there is a complex interplay between nutrients, bacteria attached to the intestinal mucosa (epimural bacterial community) and the epithelial barrier of the GALT which plays a crucial role in the maturation of the immune system during the first months of life (Celi et al., 2017), so any factor modifying the colonization of the gut may also have long-term consequences on the health of the animals. However, even though there are several evidences in both humans and laboratory animal models (Chandra, 1997) and a recent experiment has described the effects on newborn calves (Schäff et al., 2016), to our knowledge there are no studies explaining the short and long-term effects of milk replacer (MR) restriction on GALT immunity and biochemical parameters of artificial reared ewe lambs. Extending the knowledge about the mechanisms underlying nutritional programming by early feed restriction is crucial, since this circumstance –which may take place in the farm as a consequence of environmental, health or non-optimal feeding conditions– may affect the health status and animal performance of the animals along the whole life, thus decreasing the profitability of the dairy farm (e.g., reduced milk production or delay in the onset of puberty).

Therefore, the aim of the current study was to investigate the impact of moderated MR restriction on replacement dairy ewe lambs. Our working hypothesis was that early feed restriction during the artificial rearing period influences negatively GALT development, promoting gut inflammation and long-lasting changes on biochemical profile and animal performance of ewe lambs during the replacement phase.

2. Material and methods

2.1. 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 IGM-CSIC Animal Experimentation Committee (protocol number 2015-04).

2.2. Animals and milk replacer during the artificial rearing period

A flock of newborn Assaf lambs was separated from their dams just after parturition. The dams were hand-milked and the colostrum offered to the lambs by bottle-feeding for 2 d. Lambs were bottle-fed for another 2 d with commercial MR (200 g dry

Table 1
Ingredients and chemical composition of the commercial lamb milk replacer.

Ingredients, g/kg	
Skim milk powder	500
Milk whey powder	160
Vegetable oil (cocoa)	140
Animal fat (pork lard)	120
Whey protein powder	40
Hydrolysed wheat protein	15
Yeast/sodium bicarbonate /Dextrose	15
PreVIT mineral ^a	10
Chemical composition, g/kg dry matter	
Dry matter, g/kg	960
Crude protein	235
Ether extract	260
Ash	70
Metabolisable energy, kcal/kg DM	5089

^a Provided per kg milk replacer: vitamin A, 80,000 IU; vitamin D₃, 4250 IU; iron, 40 mg; cobalt, 0.2 mg; copper, 5 mg; manganese, 25 mg; zinc, 30 mg; selenium, 0.2 mg.

matter/L) (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 α -tocopherol acetate, 110 mg 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 flock to minimise the range of both, live body weight (LBW) and day of birth. Subsequently, all the lambs were stratified on the basis of LBW (on average 4.73 ± 0.116 kg), penned individually, and allocated randomly to one of two treatment groups ($n = 20$ per treatment). All the lambs were fed MR three times daily (8:30, 14:00 and 20:30 h) during the first week, and only twice daily (08:30 and 19:30 h) during the rest of the suckling period. However, whilst the first group of lambs was fed MR *ad libitum* (ADL, approx. 2.5 times maintenance energy requirements to gain 250 g/day), the second one (restricted, RES) only received approximately 62.5% of MR intake measured in the ADL group (approx. 1.5 times maintenance energy requirements to gain 100–120 g/day) (NRC, 1985; Giráldez et al., 1999). A bucket with a teat was used to feed each lamb, being removed 20 min later when the lambs either had finished the offered MR or stopped eating because they were satisfied. All the lambs were weighed twice a week throughout the suckling period and the average daily weight gain (ADG, g/d) was estimated as the regression coefficient (slope) of LBW against time using the REG procedure of the SAS package (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Ingredients and chemical composition of the MR administered are summarized in Table 1.

2.3. Slaughter procedure and ileal parameters of pre-weaned lambs

When lambs were 35-days-old, eight lambs from each group (16 lambs in total) were stunned and harvested 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. Total fat depots (omental, mesenteric and perirenal) were separated and weighed. Additionally, and immediately after slaughter, 2 g of ileal contents were collected in two different tubes (10 ml each) containing 6 ml of distilled water and 0.25 ml of 20% sulfuric acid solution to acidify the medium and stop the fermentation. Fermentation end-products (volatile fatty acids) were determined according to Carro and Miller (1999). A 10 cm segment of ileum from each animal was collected proximal to the ileocecal valve immediately after slaughter. Ileal samples were rinsed three times with sterile phosphate-buffered saline solution (pH = 7.0) to remove the digesta and divided into several portions preserved in different ways for analysis of epimural bacterial community (stored at -80 °C during 48 h, then freeze-dried), flow cytometry (sterile phosphate-buffered saline solution), histological or immunohistochemical examination (fixed by immersion in 10% buffered formalin for one week), sIgA quantification (stored at -20 °C), and gene expression of cytokines and toll-like receptors [stabilized with RNA_{later} (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) overnight at 4 °C, and stored at -80 °C]. Ileal epimural microbiota was assayed by DNA extraction and quantitative real-time PCR (qPCR); sIgA quantification in ileal mucosa was determined by ELISA; gene expression of cytokines and toll-like receptors was performed by RNA extraction of ileal samples and real-time reverse transcription PCR; all these procedures (assessed in duplicate for each parameter and lamb), together with flow cytometry (assayed in a single ileal sample per lamb), histological or immunohistochemical techniques (ten different fields were examined per parameter and lamb) performed on ileal samples were carried out according to Frutos et al. (2018a).

2.4. Animal performance and biochemical profile of replacement ewe lambs

The rest of the ADL ewe lambs ($n = 12$) were weaned progressively starting at a mean LBW of 13.5 kg (ADL), whereas the RES ewe lambs ($n = 12$) started weaning either with 11.5 kg or 70-days-old in order to ensure the viability of the lambs, but reducing at

Table 2
Ingredients and chemical composition of the total mixed ration administered to replacement lambs.

Ingredients, 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 dry matter	
Dry matter, g/kg	892
Neutral detergent fibre (aNDF) ^a	355
Acid detergent fibre (ADF)	215
Crude protein	125
Ash	75
Metabolisable energy, kcal/kg DM	2303

^a NDF was assayed with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.

the same time the differences in age or weight at weaning. The progressive weaning lasted one week for each lamb and consisted in restricting MR intake and allowing free access to a starter feed for replacement lambs (Babymix, Inatega, León, Spain), barley straw and alfalfa hay. After weaning, the lambs were moved to a single feedlot for 42 days (1st post-weaning period), and 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 total mixed ration (TMR) in feedlot until the end of the experimental period (7.5-months-old). All the ewe lambs were weighed once a week during the replacement period and the ADG during this phase estimated as previously mentioned.

Samples of the TMR offered were collected weekly and analysed for dry matter (ISO 6496:1999), ash (ISO 5984:2002), crude protein (ISO 5983:2009), aNDF (NDF was assayed with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash; Ankom Technology Corp., Macedon, NY, USA) and ADF (ADF was expressed inclusive of residual ash; Ankom Technology Corp., Macedon, NY, USA). Ingredients and chemical composition of the TMR administered are summarized in Table 2.

The 24 ewe lambs (12 animals per group) were blood sampled three times along the experiment early in the morning, at the end of the feed restriction period (1st month) or once the replacement ewes were being fed exclusively the experimental TMR (5 and 7.5 months-old). Blood samples were collected by jugular venipuncture into tubes containing lithium-heparin, placed in iced water and centrifuged at $3520 \times g$ for 16 min at 5 °C. Plasma samples were stored at –80 °C until biochemical profile analysis.

Plasma samples were analysed for haptoglobin, ceruloplasmine, beta-hydroxybutyrate (BHB), paraoxonase (PON), reactive oxygen metabolites (ROM), myeloperoxidase, ferric reducing ability of plasma (FRAP), superoxide dismutase (SOD), Ca, Mg, Zn, retinol, tocopherol, aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyl transpeptidase (GGT), total bilirubin, creatinine, glucose, insulin, urea, protein, albumin, globulin, cholesterol, low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), non-esterified fatty acids (NEFA) and triglycerides as described by Frutos et al. (2018b). Globulin was calculated as the difference between total protein and albumin. Moreover, insulin, specific for sheep, was measured using ELISA assay (Mercodia Ovine Insulin ELISA, Uppsala, Sweden) in microplates (Synergy 2, BioTek, Winooski, VT, USA). Plasma vitamins A and E were measured by extraction with hexane and reverse-phase high-performance liquid chromatography using Spherisorb ODS-2, 3 m, in a 150 × 4.6 mm column (Alltech, Deerfield, IL, USA); an ultraviolet/visible detector set at 325 nm (for vitamin A) or 290 nm (for vitamin E); and 80:20 methanol:tetrahydrofuran as the mobile phase.

2.5. Statistical analysis

Average daily gain data, together with those of total fat depots, intestinal fermentation parameters, quantification of epimural bacterial community, flow cytometry, morphometric analysis, immunohistochemistry, sIgA quantification and gene expression of toll-like receptors (TLRs) and cytokines were analyzed by one-way ANOVA using the GLM procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina) with the dietary treatment (*ad libitum* or restricted during the artificial rearing phase) as the only source of variation. In all cases, the individual lamb was considered as the experimental unit. Significance was declared at $P < 0.05$ and a tendency at $P < 0.1$.

Data corresponding to biochemical parameters measured at several growth stages (1st, 5th and 7.5th months of life of replacement ewe lambs) were analyzed as a repeated measures design using the MIXED procedure of SAS. Dietary treatment and growth stage were included in the model (the main effects of both factors and their interaction) as fixed effects. In all cases, the individual lamb was considered as the experimental unit and included in the model as a random effect. For each variable, the statistical model was fitted with different competing covariance structures, selected with the smallest value for Akaike's and Bayesian criterions. The Tukey-Kramer multiple-comparison test was used to compare means when the interaction between dietary treatment and growth stage was significant.

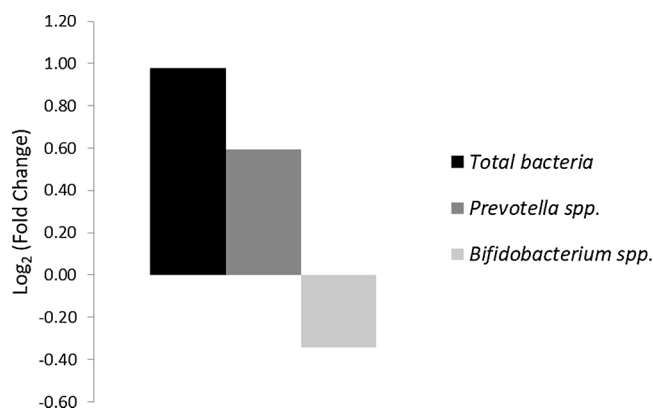


Fig. 1. Relative quantitation compared to *ad libitum* lambs (ADL) of 16S rRNA copy numbers of microbial groups attached to the ileal mucosa after early feed restriction (RES) during the suckling period. Fold-changes for specific amplicon groups were calculated as the log₂ ratio of normalized abundances. No significant differences ($P > 0.05$) calculated using Tukey's method (SAS) were observed.

3. Results

3.1. Animal performance

Both ADG during the artificial rearing period (116 vs. 237 g/day for the RES and ADL groups, respectively; SED = 20.0; $P < 0.001$) and the weight at weaning (11.2 vs. 13.7 kg; SED = 0.25; $P < 0.001$) were lower in RES lambs due to MR restriction. Thereafter, a compensatory growth period for the RES ewe lambs (non-slaughtered) was observed after weaning (274 vs. 238 g/day for the RES and ADL lambs, respectively; SED = 15.76; $P < 0.05$), but the ADG was reduced for the early feed restricted lambs once all animals were being fed *ad libitum* the TMR during the replacement phase (182 vs. 202 g/day for RES and ADL groups, respectively; SED = 8.61; $P < 0.05$). The LBW at the end of the experiment (7.5-months-old) was numerically lower for the RES ewe lambs, but no significant differences were detected (45.1 vs. 50.4 kg; SED = 3.11; $P > 0.05$).

3.2. Ileal epimural bacterial community and volatile fatty acids of pre-weaned lambs

No differences were observed for total bacteria or the relative abundance of *Bifidobacterium* spp. or *Prevotella* spp. in the ileal epimural bacterial community between experimental groups (ADL vs. RES lambs, Fig. 1). Acetate measurements were lower in the RES group compared to the ADL lambs (0.71 vs. 1.42 mmol/L; $P < 0.05$, SED = 0.242). The rest of volatile fatty acids (e.g., propionate, butyrate...) were not detected.

3.3. Ileal immunity parameters of pre-weaned lambs

The results regarding the specific ileal lymphocyte population counts (flow cytometry), thickness of ileal layers (histologic examination), ileal M-cells labelling intensity, counts of infiltrating B or T lymphocytes in the ileal lamina propria (immunohistochemistry), and sIgA concentration in ileal mucosa (ELISA) are summarized in Table 3.

Greater percentages for T lymphocytes (CD4⁺, CD8⁺, WC1⁺) were detected in the ileum of the RES group when compared to the ADL lambs ($P < 0.05$). Moreover, morphometric analysis revealed a reduced thickness of ileal submucosa layer in the RES group ($P < 0.05$) where the ileal Peyer's patches (iPP) are located (Fig. 2). In addition, the infiltration of B-cells in the ileal lamina propria (Table 3, Fig. 2) and the concentration of sIgA at ileal mucosa level were reduced ($P < 0.05$) and increased ($P < 0.05$), respectively in the RES lambs. On the contrary, the infiltration of T-cells in the ileal lamina propria (Table 3, Fig. 2) was not affected significantly by early feed restriction, but numerically higher values could be observed for the RES lambs (204 vs. 176 cells per field 40×). Also, a trend towards significantly higher percentages ($P < 0.1$) of negatively labelled regions in the epithelium region of the iPP domes was

Table 3

Lymphocyte counts by flow cytometry, morphometric analysis, immunohistochemistry, and secretory immunoglobulin A (sIgA) production in the ileum of pre-weaned lambs being fed *ad libitum* (ADL) or restricted (RES) during the artificial rearing period.

	ADL	RES	SED ^a	P-value
Lymphocytes, %^b				
CD4 ⁺	6.1	9.9	1.764	0.049
CD8 ⁺	8.1	13.7	2.587	0.047
WC1 ⁺ (gamma-delta T cells)	6.4	9.3	1.143	0.021
CD21 ⁺	18.8	12.6	3.763	0.120
CD45R ⁺	18.3	14.2	4.213	0.347
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0.77	0.81	0.118	0.724
Ileal thickness, μm				
Mucosa	980	958	61.0	0.717
Submucosa	1023	757	97.0	0.016
Muscular	178	162	21.4	0.487
Lymphocytes, number per field 40×				
CD20 ⁺ (B cells)	3.52	2.34	0.368	0.006
CD3 ⁺ (T cells)	176	204	16.6	0.138
CK18⁺ (M-cells), %^c				
High positive	3.77	1.91	6.064	0.171
Medium positive	16.0	11.0	3.75	0.238
Low positive	51.9	45.2	4.65	0.221
Negative	28.4	41.9	6.30	0.065
H-index ^d	95.1	72.9	11.00	0.083
sIgA, pg/μg total protein	10.2	14.5	1.70	0.023

^a SED, standard error of the difference.

^b Percentage of positive stained cells in sample populations of 10,000 individual cells.

^c Percentage of positive labelled area in the epithelial cells of ileal Peyer's patches dome.

^d "Histo" score (from 0 to 300), higher values indicating higher-intensity labelled area of epithelial cells according to Hirsch et al. (2003).

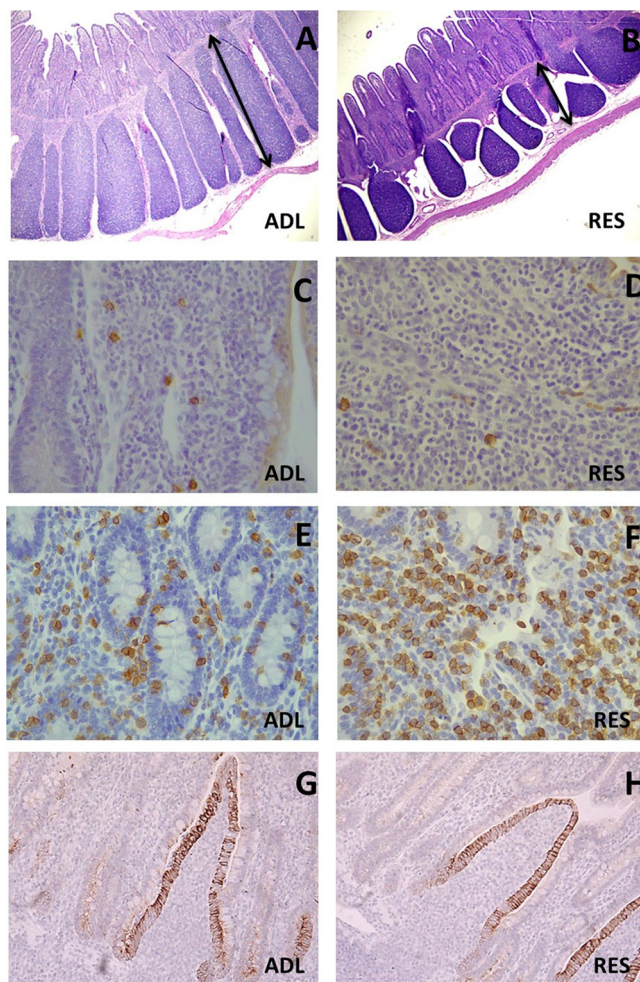


Fig. 2. Thickness of submucosa layer (arrows) in ileal segments of *ad libitum* (ADL) (A) and early feed restricted (RES) lambs (B). B cells labelled in the lamina propria of ADL (C) and RES lambs (D). T cells labelled in the lamina propria of ADL (E) and RES animals (F). Cytochrome 18 labelling (M-cells) in Peyer's patches domes of ADL (G) and RES lambs (H).

observed when M-cell marker was assessed in the RES group (Table 3, Fig. 2). This was corroborated by the H-index for M-cell, which tended to be lower in the RES group ($P < 0.1$).

Cytokines and TLRs gene expression at the ileal tissue (including iPP) is shown in Table 4. The mRNA expression of interferon gamma ($\text{IFN-}\gamma$) was greater in the RES group ($P < 0.05$) whereas transforming growth factor β ($\text{TGF-}\beta$; $P < 0.05$) and interleukin 10 (IL-10 , $P < 0.05$) were down-expressed in these lambs (a smaller ΔCq value equates to more abundant transcript). Also, interleukin 4 (IL-4 , $P < 0.1$) showed a trend towards significantly lower values in the RES lambs. In addition, gene expression of several TLRs was significantly down-regulated in the early feed restricted group (e.g., TLR-1, TLR-6, TLR-7, TLR-9; $P < 0.05$).

3.4. Biochemical profile of replacement ewe lambs

The effects of early feed restriction on biochemical profile during the artificial rearing (1st month) and replacement periods (months 5th and 7.5th of life) are presented in Table 5. Several parameters related to energy (e.g., NEFA, BHB, cholesterol, LDL), protein metabolism (e.g., creatinine, urea, and total protein), minerals (e.g., Mg) or antioxidant and anti-inflammatory conditions (e.g., PON and FRAP) were either not modified or significantly reduced in the RES lambs only during the suckling period (e.g., PON and FRAP were reduced 22.5% and 19.3%, respectively during the feed restriction period; $P < 0.05$ for the interaction between treatment and day). However, albumin and GGT reductions persisted in RES ewe lambs several months after the end of the restriction period. No significant changes were observed in the rest of parameters of the biochemical profile (e.g., haptoglobin, ceruloplasmin, ROM, myeloperoxidase, SOD, Ca, Zn, retinol, tocopherol, AST, total bilirubin, glucose, insulin, globulin, HDL and triglycerides).

Table 4

Cytokines and toll-like receptors (TLRs) mRNA expression in ileal mucosa of pre-weaned lambs being fed *ad libitum* (ADL) or restricted (RES) during the artificial rearing period.

	ADL	RES	SED ^a	P-value
Cytokines, Δ Cq ^b				
IFN- γ ^c	10.84	9.14	0.683	0.039
TGF- β ^d	3.50	4.03	0.152	0.005
IL-4 ^e	11.89	12.88	0.506	0.081
IL-10 ^f	8.76	9.39	0.217	0.016
TLRs, Δ Cq				
TLR ₁	8.00	8.70	0.291	0.036
TLR ₂	–	–	–	–
TLR ₃	10.15	10.07	0.210	0.710
TLR ₄	7.52	7.66	0.236	0.585
TLR ₅	16.74	16.28	0.742	0.558
TLR ₆	10.21	11.01	0.262	0.015
TLR ₇	8.12	8.88	0.183	0.003
TLR ₈	9.22	9.01	0.175	0.313
TLR ₉	6.73	7.43	0.289	0.037
TLR ₁₀	4.28	5.11	0.408	0.097

^a SED, standard error of the difference.

^b Cq, quantification cycle. Δ Cq = Cq (cytokines or TLRs) – Cq (β -actin). Lower Cq represents higher mRNA abundance level.

^c IFN- γ , interferon gamma.

^d TGF- β , transforming growth factor beta.

^e IL-4, interleukin 4.

^f IL-10, interleukin 10.

4. Discussion

In humans it has been observed a secondary immunodeficiency attributable to the poor nutritional status of undernourished children (Bourke et al., 2016). Accordingly, the reduction of submucosa thickness in the ileum (where iPP are located) of the RES lambs, together with the decreased staining intensity of M-cells, probably related to a reduced M-cell function (e.g., antigen uptake from the gastrointestinal tract; Mabbott et al., 2013; Prims et al., 2017) might have impacted negatively Peyer's patches maturation in the early feed restricted lambs (Rios et al., 2016).

On the other hand Manhart et al. (2000) mentioned that B lymphocytes of Peyer's patches may be more resistant to malnutrition than other immune cells. Accordingly, Rho et al. (2017) detected an increased frequency of long-lived plasma cells which can secrete large volumes of IgA in the small intestinal lamina propria of mice under severe protein-energy malnutrition (PEM) conditions. In addition, Beatty et al. (1983) also reported an enhanced synthesis of sIgA in duodenal mucosal biopsies from children with acute kwashiorkor (PEM), whereas others have observed that the transport of IgA through the epithelium can be increased by inflammatory (IFN- γ) and stress conditions (Reyna-Garfias et al., 2010). All these results seem to be in agreement with the higher levels of ileal sIgA observed in the RES lambs. It must be stated, however, that this would not be in contradiction with the reduced counts of B-cells observed in these RES lambs detected by both, flow cytometry (where only numerically lower values of CD21⁺ were observed) and immunohistochemistry analysis, since not all the B-cells are differentiated into IgA-secreting plasma cells (Rios et al., 2016).

Furthermore, all the parameters measured by flow cytometry that were related to T lymphocytes (CD4⁺, CD8⁺, WC1⁺) at ileal level were increased in the RES group. Also numerically higher values of T cells could be observed by immunohistochemistry in early feed restricted lambs. Contrarily Fló et al. (1993 and 1994) described that B-cell and T-cell maturation were delayed in the GALT of 28 days undernourished rats. Nevertheless, in accordance with our results Campbell et al. (2003) and Amadi et al. (2009) found that T cells infiltrating the lamina propria rose and B cell numbers decreased in malnourished African children, whereas Márquez et al. (2000) also observed an increase in the number of T cells in the gut lamina propria and in the epithelium of rats fed a protein-free diet. Together all these data refute a generalized reduction in immune responsiveness caused by suboptimal nutrition, supporting instead a model of phenotypic plasticity in mucosal immunity that responds to nutrient availability, age, timing or severity of undernutrition (Bourke et al., 2016). However, the age of the lambs and the lack of nutrients during the early life make our study more comparable to those found in malnourished African children (Campbell et al., 2003; Amadi et al., 2009).

In any case, the ileal down-regulation of genes encoding anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10 and TGF- β), together with the significant upper transcription of IFN- γ seemed to indicate a pro-inflammatory condition in the small intestine of RES lambs. These results are, again, in accordance with Campbell et al. (2003) and Amadi et al. (2009), who reported a Th1-dominated response in the small bowel of malnourished children, with a decrease of TGF- β expression and an up-regulated expression of IFN- γ . Regarding ruminants, a previous study (Frutos et al., 2018a,b) describing the long-term effects of early feed restriction during the fattening phase of lambs (once re-feeding was restored) suggested a relationship between increments of *Prevotella* spp. (concomitant with associated decreases in *Bifidobacterium* spp.) and pro-inflammatory conditions at ileal level. However, although a similar trend could be observed in the present study, our ileal samples were collected early during the restriction phase, which probably prevented the observation of significant changes in the relative abundances of *Prevotella* spp. or *Bifidobacterium* spp. in the RES lambs. Moreover, in

Table 5
Biochemical parameters of lambs fed *ad libitum* (ADL) or restricted (RES) during the artificial rearing period.

	1 st month		5 th month		7.5 th month		SED ₁ ¹	SED ₂ ²	P-value		
	ADL	RES	ADL	RES	ADL	RES			T ³	D ⁴	T*D ⁵
Haptoglobin, g/L	0.510	0.556	0.272	0.402	0.171	0.387	0.1701	0.1772	0.450	0.341	0.893
Ceruloplasmine, μmol/L	3.86	4.24	2.70	2.97	2.53	2.76	0.445	0.308	0.514	< 0.001	0.967
BHB ⁶ , mmol/L	0.574 ^c	0.147 ^a	0.518 ^c	0.523 ^c	0.279 ^b	0.282 ^b	0.0402	0.0425	0.002	< 0.001	< 0.001
PON ⁷ , U/L	173 ^b	134 ^a	159 ^b	149 ^{ab}	166 ^b	152 ^b	12.5	4.86	0.106	0.455	0.012
ROM ⁸ , mg/100 ml	20.5	20.8	15.3	16.3	14.3	15.3	1.74	1.24	0.672	< 0.001	0.951
Myeloperoxidase, U/L	550	486	470	481	532	495	49.4	48.8	0.550	0.630	0.747
FRAP ⁹ , μmol/L	155 ^b	125 ^a	134 ^a	133 ^a	134 ^a	131 ^a	5.77	5.32	0.065	0.289	0.018
SOD ¹⁰ , U/L	1.03	0.962	1.25	1.22	1.34	1.46	0.125	0.086	0.952	< 0.001	0.500
Ca, mmol/L	2.84	2.79	2.91	2.84	2.83	2.84	0.027	0.0327	0.151	0.160	0.483
Mg, mmol/L	1.031 ^c	0.852 ^a	0.931 ^b	0.906 ^b	0.907 ^b	0.911 ^b	0.0166	0.0161	< 0.001	0.130	< 0.001
Zn, mmol/L	22.6	20.3	17.2	15.8	18.3	17.3	1.13	1.15	0.172	< 0.001	0.852
Retinol, ug/100 ml	22.0	22.5	53.3	45.2	58.0	49.1	3.92	3.21	0.174	< 0.001	0.286
Tocopherol, ug/ml	1.16 ^b	1.42 ^b	0.782 ^a	0.700 ^a	0.681 ^a	0.620 ^a	0.115	0.071	0.732	< 0.001	0.036
AST ¹¹ , U/L	90.7	85.0	139	127	141	127	6.40	5.86	0.116	< 0.001	0.776
GGT ¹² , U/L	90.4	74.2	58.3	51.1	62.1	52.3	3.89	2.40	0.009	< 0.001	0.170
Total bilirubin, μmol/L	2.65	2.37	0.77	0.86	0.62	0.56	0.314	0.381	0.796	< 0.001	0.887
Creatinine, μmol/L	80.8 ^c	67.9 ^a	76.7 ^{bc}	73.3 ^b	78.9 ^{bc}	74.0 ^b	2.37	1.55	0.007	0.382	0.008
Glucose, mmol/L	4.64	5.40	5.63	5.24	5.00	5.13	0.196	0.236	0.411	0.166	0.064
Insulin, ng/L	96.2	105	297	199	265	270	48.03	59.73	0.563	0.032	0.313
Urea, mmol/L	7.29 ^{bc}	4.63 ^a	6.95 ^b	6.12 ^b	8.03 ^c	7.25 ^{bc}	0.459	0.411	0.005	< 0.001	0.042
Protein, g/L	61.1	55.7	70.1	68.0	70.6	69.2	1.24	1.20	0.028	< 0.001	0.211
Albumin, g/L	33.6 ^b	30.4 ^a	37.1 ^d	35.8 ^c	36.7 ^{cd}	36.0 ^c	0.39	0.36	< 0.001	< 0.001	0.005
Globulin, g/L	27.6	25.3	33.1	32.3	33.8	33.3	1.12	1.10	0.297	< 0.001	0.713
Cholesterol, mmol/L	2.78 ^c	2.17 ^b	1.93 ^a	1.71 ^a	1.88 ^a	1.80 ^a	0.123	0.078	0.022	< 0.001	0.005
LDL ¹³ , mmol/L	0.561 ^b	0.298 ^a	0.574 ^b	0.457 ^b	0.493 ^b	0.461 ^b	0.040	0.028	0.002	0.016	< 0.001
HDL ¹⁴ , mmol/L	1.46	1.43	0.989	0.913	1.03	0.987	0.090	0.048	0.577	< 0.001	0.891
NEFA ¹⁵ , g/L	1.13 ^c	0.486 ^b	0.117 ^a	0.123 ^a	0.136 ^a	0.182 ^a	0.056	0.069	0.002	< 0.001	< 0.001
Triglycerides, mmol/L	0.302	0.398	0.171	0.164	0.160	0.176	0.0256	0.0238	0.178	< 0.001	0.085

a, b, c, d Values within a row with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$ for dietary treatment or growth stage.

¹ SED₁, standard error of the difference to compare dietary treatments.

² SED₂, standard error of the difference to compare days.

³ T, dietary treatment.

⁴ D, day.

⁵ T*D, interaction between treatment and day.

⁶ BHB, beta-hydroxybutyrate.

⁷ PON, paraoxonase.

⁸ ROM, reactive oxygen metabolites.

⁹ FRAP, ferric reducing ability of plasma.

¹⁰ SOD, superoxide dismutase.

¹¹ AST, aspartate aminotransferase.

¹² GGT, gamma glutamyl transpeptidase.

¹³ LDL, low-density lipoprotein.

¹⁴ HDL, high-density lipoprotein.

¹⁵ NEFA, non-esterified fatty acids.

agreement with Sun et al. (2001), Gomes de Moraes et al. (2017), Da Costa et al. (2017) and Frutos et al. (2018a,b) a down-regulation of some TLRs [pattern-recognition receptors of pathogen-associated molecular patterns located in several cell types such as macrophages, T and B cells or non-immune cells] was observed in RES lambs, which has been suggested as a mechanism implemented to keep the homeostasis at intestinal level (Zhang and Ghosh, 2002; Malmuthuge et al., 2012; Villena et al., 2014). In any case, all these alterations in the gut could be, at least, partially responsible for the reduced animal performance of RES lambs.

The decreased energy and protein intake of RES lambs during the suckling period might have impaired liver functionality as suggested by the lower levels of albumin, GGT, FRAP, PON and cholesterol observed for the RES lambs during the first month of life (Bionaz et al., 2007; Bertoni and Trevisi, 2013). Moreover, the lower levels of NEFA and BHB in the RES lambs during the suckling period, together with the lower total fat depots of these animals (292 vs. 111 g for ADL and RES lambs, respectively; SED = 4.81; $P < 0.001$) suggest that adipose tissue was exhausted after a month of MR restriction. In addition, the lower levels of creatinine in the pre-weaned RES lambs seem to be indicating a reduced muscle mass in absolute terms (Agenäs et al., 2006). Most of these effects on the biochemical profile disappeared, at least partially (no significant effects, but numerically different values during the 5th and 7.5th months of life), once the refeeding conditions were restored, whereas the rest of biochemical parameters (e.g., haptoglobin, ceruloplasmine, ROM, myeloperoxidase, SOD, Ca, Zn, retinol, tocopherol, AST, total bilirubin, glucose, insulin, globulin, HDL and triglycerides) were not modified at any time. However, the lower values of albumin and GGT in the RES lambs are remarkable

because they persisted several months after the feed restriction period was ended, suggesting negative residual effects on liver functionality which might have further impaired animal performance along the replacement phase. It must be considered that GGT enables the metabolism of antioxidants, inflammatory molecules, drug metabolites, glutathione and glutathionylated xenobiotics (Koenig and Seneff, 2015). Therefore, the lower levels of GGT observed in the RES ewe lambs along the whole experimental period might be associated to several indicators of intracellular stress and inflammatory response (e.g., phosphatidylserine compounds and prostaglandin E2-biotin) that were over accumulated in the plasma of these animals according to their metabolome profile published previously elsewhere (Santos et al., 2018). Moreover, other studies have shown that malnutrition is related to oxidative stress conditions as a consequence of chronic inflammation events (Ece et al., 2007). In the present study a transitory imbalance in the antioxidant status during the suckling period could be observed in the pre-weaned RES lambs (e.g., lower FRAP and PON values), which also manifested pro-inflammatory conditions at ileal level. However, the lack of significant differences in the positive acute-phase proteins involved in inflammation (e.g., haptoglobin and ceruloplasmin) or in those parameters related to metabolic disorders such as insulin resistance (e.g., glucose and insulin) differ from those results previously observed in early feed restricted fattening lambs (Frutos et al., 2018b). This apparent contradiction might be explained by the different diets administered during the refeeding period in each experiment: whilst the replacement ewes were fed a TMR rich in fibre, the fattening lambs were fed an acidogenic diet (e.g., rich in cereals and carbohydrates) which together with the pro-inflammatory conditions promoted by early feed restriction might have compromised the health status under stressful diet conditions.

5. Conclusions

In conclusion, under the conditions of the present study our results suggest that the reduced animal performance observed in early feed restricted ewe lambs is associated with pro-inflammatory conditions in the gut and a persistent impaired liver functionality after the period of feed restriction.

Declaration of interest

None.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO, AGL2014-54124R). Javier Frutos was supported by CSIC (Proyecto Intramural Especial; Project 201540E084) and Ayudas Puente Formativas (Universidad de León) with a training contract. Alba Santos gratefully acknowledges receipt of a pre-doctoral grant from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (MECD, FPU15/01630).

References

- Agenäs, S., Heath, M.F., Nixon, R.M., Wilkinson, J.M., Phillips, C.J.C., 2006. Indicators of undernutrition in cattle. *Anim. Welf.* 15, 149–160.
- Amadi, B., Fagbemi, A.O., Kelly, P., Mwiya, M., Torrente, F., Salvestrini, C., Day, R., Golden, M.H., Eklund, E.A., Freeze, H.H., Murch, S.H., 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>.
- Beatty, D.W., Napier, B., Sinclair-Smith, C.C., McCabe, K., Hughes, E.J., 1983. Secretory IgA synthesis in Kwashiorkor. *J. Clin. Lab. Immunol.* 12, 31–36.
- Bertoni, G., Trevisi, E., 2013. Use of the Liver Activity Index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy herds. *Vet. Clin. Food Anim.* 29, 413–431. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.04.004>.
- Bionaz, M., Trevisi, E., Calamari, L., Librandi, F., Ferrari, A., Bertoni, G., 2007. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions and liver function in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 1740–1750. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-445>.
- Bourke, C.D., Berkley, J.A., Prendergast, A.J., 2016. Immune dysfunction as a cause and consequence of malnutrition. *Trends Immunol.* 37, 386–398. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.04.003>.
- Campbell, D.I., Murch, S.H., Elia, M., Sullivan, P.B., Sanyang, M.S., Jobarteh, B., Lunn, P.G., 2003. Chronic T cell-mediated enteropathy in rural west African children: relationship with nutritional status and small bowel function. *Pediatr. Res.* 54, 306–311. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000076666.16021.5E>.
- Carro, M.D., Miller, E.L., 1999. Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an in vitro semicontinuous culture system (RUSITEC). *Br. J. Nutr.* 82, 149–157. <https://doi.org/10.1017/S0007114599001300>.
- Celi, P., Cowieson, A.J., Fru-Nji, F., Steinert, R.E., Klünter, A.M., Verlhac, V., 2017. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: new opportunities for sustainable animal production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 234, 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.09.012>.
- Chandra, R.K., 1997. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am. J. Clin. Nutr.* 66, 460S–463S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/66.2.460S>.
- Da Costa, T.B., De Moraes, N.G., De Lira, J.M., De Almeida, T.M., Gonçalves-De-Albuquerque, S.D., Pereira, V.R., De Paiva Cavalcanti, M., De Castro, C.M., 2017. Relation between neonatal malnutrition and gene expression: inflammasome function in infections caused by *Candida albicans*. *Eur. J. Nutr.* 56, 693–704. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-1113-9>.
- Ece, A., Gurkan, F., Celik, F., Bosnak, M., Yel, S., Balik, H., Erel, O., 2007. Paraoxonase, total antioxidant activity and peroxide levels in marasmic children: relationships with leptin. *Clin. Biochem.* 40, 634–639. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.03.001>.
- Fló, J., Massouh, E.J., Roux, M.E., 1993. Long term effects of malnutrition during lactation on GALT. *Reg. Immunol.* 5, 100–105.
- Fló, J., Elias, F., Massouh, E., Roux, M.E., 1994. Impairment of B-cell and T-cell maturation in gut-associated lymphoid-tissues due to malnutrition during lactation. *Dev. Comp. Immunol.* 18, 543–555. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(06\)80008-X](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(06)80008-X).
- Frutos, J., Andrés, S., Yáñez-Ruiz, D.R., Benavides, J., López, S., Santos, A., Martínez-Valladares, M., Rozada, F., Giráldez, F.J., 2018a. Early feed restriction of lambs modifies ileal epimural microbiota and affects immunity parameters during the fattening period. *Animals (Apr. (22))*, 1–8. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000836>.
- Frutos, J., Andrés, S., Trevisi, E., Yáñez-Ruiz, D.R., López, S., Santos, A., Giráldez, F.J., 2018b. Early feed restriction programs metabolic disorders in fattening Merino lambs. *Animals* 8 (6), 83. <https://doi.org/10.3390/ani8060083>.
- Giráldez, F.J., Frutos, P., Lavín, P., Mantecón, A.R., 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).
- Gomes de Morais, N., Barreto da Costa, T., Bezerra de Lira, J.M., da Cunha Gonçalves de Albuquerque, S., Alves Pereira, V.R., de Paiva Cavalcanti, M., Machado Barbosa de Castro, C.M., 2017. TLR and NLRP3 inflammasome expression deregulation in macrophages of adult rats subjected to neonatal malnutrition and infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nutrition 33, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.06.005>.
- Hirsch, F.R., Varella-Garcia, M., Bunn, P.A., Di Maria, M.V., Veve, R., Bremnes, R.M., Baron, A.E., Zeng, C., Franklin, W.A., 2003. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. J. Clin. Oncol. 21, 3798–3807. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.11.069>.
- Koenig, G., Seneff, S., 2015. Gamma-glutamyltransferase: a predictive biomarker of cellular antioxidant inadequacy and disease risk. Dis. Markers. <https://doi.org/10.1155/2015/818570>. Article ID 818570.
- Mabbott, N.A., Donaldson, D.S., Ohno, H., Williams, I.R., Mahajan, A., 2013. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. Mucosal Immunol. 6, 666–677. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.30>.
- Malmuthuge, N., Li, M., Fries, P., Griebel, P.J., Guan, L.L., 2012. Regional and age dependent changes in gene expression of toll-like receptors and key antimicrobial defence molecules throughout the gastrointestinal tract of dairy calves. Vet. Immunol. Immunopathol. 146, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.01.010>.
- Manhart, N., Vierlinger, K., Bergmeister, H., Boltz-Nitulescu, G., Spittler, A., Roth, E., 2000. Influence of short-term protein malnutrition of mice on the phenotype and costimulatory signals of lymphocytes from spleen and Peyer's patches. Nutrition 16, 197–201. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(99\)00279-8](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(99)00279-8).
- Márquez, M.G., Galeano, A., Olmos, S., Roux, M.E., 2000. Flow cytometric analysis of intestinal intraepithelial lymphocytes in a model of immunodeficiency in Wistar rats. Cytometry 41, 115–122. [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20001001\)41:2<115::AID-CYTO6>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20001001)41:2<115::AID-CYTO6>3.0.CO;2-5).
- NRC (National Research Council), 1985. Nutrient Requirements of Sheep, sixth ed. National Academy Press, Washington, D.C.
- Prims, S., Pintens, N., Vergauwen, H., Van Cruchten, S., Van Ginneken, C., Casteleyn, C., 2017. Effect of artificial rearing of piglets on the volume densities of M cells in the tonsils of the soft palate and ileal Peyer's patches. Vet. Immunol. Immunopathol. 184, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.12.009>.
- Reyna-Garfias, H., Miliar, A., Jarillo-Luna, A., Rivera-Aguilar, V., Pacheco-Yépez, J., Baeza, I., Campos-Rodríguez, R., 2010. Repeated restraint stress increases IgA concentration in rat small intestine. Brain Behav. Immun. 24, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.09.005>.
- Rho, S., Kim, H., Shim, S.H., Lee, S.Y., Kim, M.J., Yang, B.G., Jang, M.H., Hail, B.W., Song, M.K., Czerkinsky, C., Kim, J.O., 2017. Protein energy malnutrition alters mucosal IgA responses and reduces mucosal vaccine efficacy in mice. Immunol. Lett. 190, 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.08.025>.
- Rios, D., Wood, M.B., Li, J., Chassaing, B., Gewirtz, A.T., Williams, I.R., 2016. Antigen sampling by intestinal M cells is the principal pathway initiating mucosal IgA production to commensal enteric bacteria. Mucosal Immunol. 9, 907–916. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.121>.
- Santos, A., Giráldez, F.J., Valdés, C., Trevisi, E., Lucini, L., Frutos, J., Andrés, S., 2018. 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. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14648>. (In press).
- Schäff, C.T., Gruse, J., Maciej, J., Mielenz, M., Wirthgen, E., Hoeflich, A., Schmicke, M., Pfuhl, R., Jawor, P., Stefaniak, T., Hammon, H.M., 2016. Effects of feeding milk replacer *ad libitum* or in restricted amounts for the first five weeks of life on the growth, metabolic adaptation, and immune status of newborn calves. PLoS One 11, e0168974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168974>.
- Sun, D., Muthukumar, A.R., Lawrence, R.A., Fernandes, G., 2001. Effects of calorie restriction on polymicrobial peritonitis induced by cecum ligation and puncture in young C57BL/6 mice. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, 1003–1011. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.5.1003-1011.2001>.
- Villena, J., Aso, H., Kitazawa, H., 2014. Regulation of toll-like receptors-mediated inflammation by immunobiotics in bovine intestinal epitheliocytes: role of signaling pathways and negative regulators. Front. Immunol. 5, 421. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00421>.
- Zhang, G.L., Ghosh, S., 2002. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. J. Biol. Chem. 277, 7059–7065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109537200>.

Capítulo V

Milk restricted lambs have greater colonic butyrate and a transitory modified anti-oxidant status

Publicado en: *Advances in Animal Biosciences*

Milk restricted lambs have greater colonic butyrate and a transitory modified anti-oxidant statusJavier Frutos¹, F. Javier Giráldez¹, Julio Benavides¹, Erminio Trevisi², Nuria Santos¹, Alba Santos¹, Sonia Andrés¹¹Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-Universidad de León, Finca Marzanas s/n, 24346, Grulleros, León, Spain, ²Faculty of Agriculture, Food and Environmental Science, Institute of Zootechnics, Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Emilia Parmense 84, 29122, Piacenza, ItalyE-mail: sonia.andres@eae.csic.es**Take home message** Milk restriction of suckling lambs promotes an anti-inflammatory response in the colon and a transitory modified anti-oxidant status.**Introduction** Nutritional interventions during early life may affect the development of the gastrointestinal tract and the maturation of the immune system, compromising metabolism and health status in the later stages of life (Bach, 2012). Thus, the aim of this study was to investigate the impact of moderate milk restriction during the suckling period of Assaf lambs on colonic parameters and long-term effects on biochemical parameters related to inflammatory response and oxidative stress.**Material & methods** Forty Assaf lambs (average BW 4.73 kg) were penned individually, twenty of them were fed milk replacer (200 g dry matter/L) *ad libitum* (ADL; 192 mL/kg LBW) whereas the other group (restricted, RES) only received 120 mL/kg LBW. Eight lambs from each group were slaughtered at 35-days-old and colonic samples were collected for volatile fatty-acid analysis, analysis of microbial composition (qPCR), study of gene expression of toll-like receptors and cytokines (qRT-PCR), quantification of secretory IgA (ELISA), morphometric analysis (thickness of colonic layers) and immunohistochemistry examination (e.g., lymphocytes infiltrated in the lamina propria). The rest of the lambs (12 ADL vs. 12 RES) were weaned progressively, offered alfalfa hay and a starter concentrate *ad libitum* during 6 weeks and then a total mixed ration (TMR) *ad libitum* until the end of the experiment. Animals were blood sampled at the end of the feed restriction period (1st month) and once when the ewe lambs were being fed exclusively the TMR (6th and 8th months). Colonic parameters were analysed using GLM procedure of SAS, with the milk replacer intake level as the only source of variation. Biochemical parameters were analysed as a repeated measures design using the MIXED procedure of SAS.**Results & discussion** During the suckling period, a greater proportion of butyrate (4.47 % vs. 7.07 %, P=0.014) and a trend towards an increased expression of the anti-inflammatory cytokines TGF- β (P=0.055) and IL-4 (P=0.081) were found in the colon of RES lambs. These results could be associated with an increase of *Butyrivibrio spp.* and the lower relative abundance of *Prevotella spp.* observed in the colonic mucosa of restricted lambs. The rest of colonic parameters and two positive acute-phase proteins (e.g., haptoglobin and ceruloplasmin) related to inflammatory response were not affected by milk replacer restriction, but levels of albumin, paraoxanase and total antioxidant activity (FRAP) were significantly reduced in RES lambs at the end of the 1st month of life, probably due to a decreased nutrient intake (Table 1).**Table 1** Biochemical parameters of lambs fed *ad libitum* (n=12, ADL) or restricted (n=12, RES) during the suckling period.

	1 st month		6 th month		8 th month		SED ₁		SED ₂		P-value	
	ADL	RES	ADL	RES	ADL	RES	SED ₁	SED ₂	T	D	T*D	
Haptoglobin, g/L	0.51	0.56	0.27	0.40	0.17	0.39	0.170	0.177	0.450	0.341	0.893	
Ceruloplasmin, μ mol/L	3.86	4.24	2.70	2.97	2.53	2.76	0.445	0.308	0.514	<0.001	0.967	
Paraoxanase, U/L	173 ^b	134 ^a	159 ^b	149 ^{ab}	166 ^b	152 ^b	12.5	4.86	0.106	0.455	0.012	
ROM, mg/100 mL	20.5	20.8	15.3	16.3	14.3	15.3	1.74	1.24	0.672	<0.001	0.951	
FRAP, μ mol/L	155 ^b	125 ^a	134 ^a	133 ^a	134 ^a	131 ^a	5.77	5.32	0.065	0.289	0.018	
SOD, U/L	1.03	0.962	1.25	1.22	1.34	1.46	0.125	0.086	0.952	<0.001	0.500	
Retinol, ug/100 mL	22.0	22.5	53.3	45.2	58.0	49.1	3.92	3.21	0.174	<0.001	0.286	
Tocopherol, ug/mL	1.16	1.42	0.782	0.700	0.681	0.620	0.115	0.071	0.732	<0.001	0.036	
Albumin, g/L	33.6 ^b	30.4 ^a	37.1 ^d	35.8 ^c	36.7 ^{cd}	36.0 ^c	0.39	0.36	<0.001	<0.001	0.005	

SED₁, standard error of the difference to compare dietary treatments; SED₂, standard error of the difference to compare days; T, dietary treatment; D, day; T*D, interaction between treatment and day.**Conclusion** Moderated milk replacer restriction of artificially reared suckling lambs promoted both, an anti-inflammatory response of the colon and a transitory modified antioxidant status that was corrected after weaning.**Acknowledgements** This research was supported by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competiveness (MINECO, AGL2014-54124R), CSIC (Project 201540E084), Ayudas Puente Formativas (Universidad de León) and the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (MECD, FPU15/01630).**References**

Bach A 2012. Journal of Animal Science 90, 1835-1845.

DISCUSIÓN GENERAL

Parámetros inmunitarios y microbiota epimural de íleon y colon

En los primeros días de vida tiene lugar una compleja interacción a nivel de las mucosas entre las células inmunitarias y la microbiota comensal que puede modularse a través de la alimentación. En este sentido, la restricción alimentaria durante este periodo puede modificar la colonización bacteriana del tracto gastrointestinal (Preidis et al., 2015) y afectar al desarrollo del sistema inmunitario y al rendimiento productivo en etapas posteriores (Moallem et al., 2010, Ballou et al., 2015).

En nuestro estudio, la ingesta restringida de lactorreemplazante no afectó de forma significativa a la comunidad bacteriana epimural del íleon y del colon durante la lactancia (Exp. II), probablemente debido a la elevada variabilidad individual que exhibe la microbiota adherida a la mucosa intestinal durante las primeras semanas de vida (Song et al., 2018). A través de la ingestión de calostro y leche, los recién nacidos pueden adquirir bacterias comensales beneficiosas, como los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Yeoman et al., 2018), que impiden la adhesión de microorganismos patógenos al epitelio intestinal y estimulan al sistema inmunitario en las mucosas (Uyeno et al., 2015). Al aumentar la edad de los animales, la abundancia de estos géneros bacterianos en la mucosa intestinal disminuye (Song et al., 2018) y paralelamente se incrementa la abundancia de *Prevotella spp.* (Jami et al., 2013, Dias et al., 2018). No obstante, el menor flujo de nutrientes en los corderos restringidos durante la lactancia (grupo RES) pudo haber favorecido en mayor medida el establecimiento de *Prevotella spp.* en la mucosa del íleon en la fase de cebo (Exp. I), gracias a la habilidad del lipopolisacárido de *Prevotella spp.* para adherirse e invadir las células del hospedador (Lee et al., 2010). Además, el incremento en la abundancia del género *Prevotella* puede provocar inflamación crónica (Lukens et al., 2014, Ley, 2016, Larsen, 2017), lo que pudo haber reducido la eficiencia alimentaria de los corderos del grupo RES en la fase de cebo (Exp. I). De acuerdo con

nuestros resultados, diversos estudios realizados en rumiantes han encontrado una mayor abundancia del género *Prevotella* en el contenido de colon (Myer et al., 2015) y en el líquido ruminal (Carberry et al., 2012, McCann et al., 2014, Ellison et al., 2017) de los animales con menor eficiencia alimentaria.

La ingestión restringida de leche no modificó prácticamente ningún parámetro inmunitario e histológico de todos los que se estudiaron en el colon durante el periodo de restricción (Exp. II) ni tampoco se observaron efectos en la fase de cebo (Exp. I) una vez restablecida la alimentación. La tendencia hacia una mayor expresión génica de las citoquinas antiinflamatorias IL-4 y TGF- β en el colon de los corderos restringidos durante la lactancia (Exp. II) difiere de los resultados de dos Santos-Junior et al. (2016), que describieron una menor concentración de IL-4 y mayores concentraciones de citoquinas proinflamatorias en el colon de ratas lactantes restringidas. Estas diferencias pueden deberse a que los corderos nacen más desarrollados que las crías de roedores, por lo que la lactancia restringida en roedores es más comparable a la restricción alimentaria en el último tercio de la gestación ovina (Kongsted et al., 2014). De hecho, cuando la restricción alimentaria en ratas tiene lugar en un estado fisiológico más avanzado, se produce un aumento en el número de células teñidas con anticuerpos IgA y CD45RA (un marcador específico de los linfocitos B) en la lámina propia del colon (Nayak et al., 2009), lo que puede reflejar una mejor respuesta inmunitaria humoral a este nivel.

Con respecto a lo que se observó en el íleon, el grupo RES presentó alteraciones histológicas e inmunitarias a este nivel durante la lactancia (Exp. II), como lo evidencian la submucosa más fina (donde se localizan las placas de Peyer) y la menor intensidad de tinción de las células M con el anticuerpo citoqueratina 18 (CK18) en el epitelio. La presencia del filamento CK18 está directamente correlacionada con la función de las células M (Gebert et al., 1994, Prims et al., 2017), por tanto, la menor intensidad de

tinción de las células M con el anticuerpo CK18 podría ser indicativa de una menor actividad de estas células en la captación de antígenos en el epitelio del grupo RES (Exp. I). Al final del periodo de restricción, la menor disponibilidad de nutrientes en los corderos restringidos (Exp. II) impidió el desarrollo normal de sus tejidos, incluidas las PP, y aumentó la expresión génica de la citoquina proinflamatoria IFN- γ . Debido a que el procesamiento antigénico es un requisito fundamental para la maduración del sistema inmunitario en las mucosas (Kelly and Coutts, 2000, Rios et al., 2016), la menor actividad de las células M en los corderos restringidos también pudo interferir con el desarrollo de las PP. En concordancia con nuestras observaciones, los estudios de medicina humana han descrito una atrofia de tejidos linfoides como el timo (Rytter et al., 2014, Bourke et al., 2016) y un aumento en la expresión de IFN- γ en la mucosa del intestino delgado durante la desnutrición infantil (Amadi et al., 2009).

Sin embargo, durante el periodo de cebo, la restauración de la alimentación aumentó la disponibilidad de nutrientes, lo que puede explicar, al menos parcialmente, el incremento en el grosor de la submucosa del íleon en los corderos de cebo del grupo RES (Exp. I). Una posible limitación del Exp. I es que, en el momento de recogida de muestras del íleon, los corderos del grupo RES tenían más edad que los que se habían alimentado *ad libitum* durante la lactancia (129 vs. 104 días), lo que ha podido influir sobre algunos de los parámetros inmunitarios estudiados (Fries et al., 2011, Malmuthuge et al., 2012). No obstante, las PP de los corderos involucionan a partir de los 90 días de vida (Reynolds and Morris, 1983), de manera que el mayor grosor de la submucosa del íleon en el grupo RES no podría atribuirse a su edad más avanzada. Además, aunque la actividad de las células M en el epitelio asociado a las PP se reduce con la edad (Kobayashi et al., 2013), los corderos restringidos presentaban unas células M teñidas más intensamente, lo que podría estar asociado a una mayor actividad de estas células. Estas evidencias, por tanto,

resultan indicativas de que los cambios observados a nivel del íleon en los corderos del grupo RES (Exp. I) son independientes de la edad y probablemente están causados por la restricción de alimento en la lactancia, que habría programado la respuesta inmunitaria a nivel del íleon hacia un perfil proinflamatorio.

La respuesta inflamatoria podría desencadenarse en estos animales como consecuencia de una mayor abundancia relativa de *Prevotella spp.* -favorecida por el menor flujo de nutrientes y la capacidad del lipopolisacárido de *Prevotella spp.* para adherirse a las células del epitelio (Lee et al., 2010)- y de otras variaciones a nivel de la microbiota epimural del íleon. Esta hipótesis parece corroborada por la menor expresión génica de varios TLRs y de TGF- β y la mayor infiltración de linfocitos T que se observaron tanto en el Exp. I como en el Exp. II a nivel del íleon en los corderos del grupo RES. La disminución en la expresión de los TLRs, que son unos receptores del sistema inmunitario innato encargados del reconocimiento antigénico, ha sido asimismo descrita en roedores durante periodos de restricción nutritiva (Sun et al., 2001, Fock et al., 2007, Costa et al., 2011) y tras varias semanas de realimentación (Da Costa et al., 2017, Gomes de Moraes et al., 2017), pudiendo ser un mecanismo adaptativo con el fin de evitar una excesiva respuesta inflamatoria y mantener la homeostasis intestinal (Zhang and Ghosh, 2002, Malmuthuge et al., 2012, Villena et al., 2014). La disminución en la expresión de la citoquina antiinflamatoria TGF- β y el aumento en la infiltración de linfocitos T en la lámina propia intestinal durante la lactancia restringida (Exp. II) también han sido descritos en niños desnutridos (Campbell et al., 2003, Amadi et al., 2009). Asimismo, de acuerdo con nuestras observaciones (Exp. I), la mayor infiltración de linfocitos T que presentan los niños desnutridos se mantiene después de una fase de recuperación nutricional (Amadi et al., 2009). En conjunto, estos datos sugieren que los cambios provocados por la restricción de alimento en la lactancia permanecen en el periodo

posdestete, y que pueden ser una de las causas subyacentes a la menor eficiencia alimentaria que muestran durante el periodo de cebo los animales que estuvieron restringidos en la lactancia.

Finalmente, cabe destacar que el incremento en la concentración de IgA secretada en el íleon durante la lactancia restringida (Exp. II) puede deberse a una mayor capacidad individual de las células plasmáticas para producir este anticuerpo en periodos de desnutrición o de restricción dietética (Beatty et al., 1983, Lara-Padilla et al., 2011, Rho et al., 2017) o a un aumento en el transporte de IgA a través del epitelio intestinal, favorecido por las condiciones de estrés o proinflamatorias (Reyna-Garfias et al., 2010). Los corderos del grupo RES también mostraron una mayor concentración de IgA en el íleon durante el periodo de cebo (Exp. I), al igual que se ha observado en niños después de una fase de recuperación nutricional (Beatty et al., 1983), probablemente para neutralizar productos microbianos con actividad proinflamatoria como el lipopolisacárido de *Prevotella spp.* (Cerutti and Rescigno, 2008).

Parámetros bioquímicos de metabolismo energético y función hepática

Los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, NEFA y BHB no se vieron afectados en los corderos restringidos durante la fase de lactancia (Exp. I), lo que indica que la restricción de alimento en las condiciones de este estudio no promovió la instauración de un balance energético negativo. Aunque no se observaron cambios significativos en las concentraciones plasmáticas de glucosa y triglicéridos entre las corderas lactantes de los grupos *ad libitum* (ADL) y RES (Exp. II), los menores niveles de NEFA y BHB hallados en las corderas del último grupo sugieren que la movilización de grasa durante los periodos posprandiales fue menor en el grupo RES que en el ADL (Caldeira et al., 2007). En este sentido, es conocido que la concentración plasmática de NEFA varía a lo largo del día, disminuyendo de forma acusada tras la ingestión e incrementándose

posteriormente durante el periodo de ayuno entre comidas (Frayn et al., 1997, Kaufhold et al., 2000, Jelic et al., 2009). Los mayores depósitos de grasa en las corderas del grupo ADL posibilitarían también una mayor movilización posprandrial y, en consecuencia, una mayor concentración plasmática de NEFA. Cabe indicar que los corderos lactantes pueden incrementar su peso incluso en periodos de balance energético negativo, utilizando las reservas de grasa como fuente de energía para la síntesis y el depósito de proteína (Giráldez et al., 1999), por lo que la mayor movilización de grasa del grupo ADL sería compatible con la mayor ganancia diaria de peso expresada.

Las diferencias en los resultados obtenidos entre ambos experimentos pueden deberse al distinto método de restricción aplicado y a que, como consecuencia de ello, las corderas restringidas del Exp. II sufriesen una restricción más severa que el grupo RES del Exp. I, ya que crecieron a un ritmo mucho más lento. En cualquier caso, la restricción de alimento durante la lactancia no afectó a las concentraciones plasmáticas de glucosa, triglicéridos, NEFA y BHB después del destete, una vez que se había restaurado la alimentación en los Exp. I y II. La ausencia de efectos prolongados sobre estos parámetros coincide con los resultados obtenidos en terneros que habían sido criados con cantidades limitadas de lactorreemplazante durante las primeras semanas de vida (Maccari et al., 2015).

Por otra parte, cabe destacar que la desnutrición fetal durante la gestación ovina se ha vinculado con la aparición de alteraciones en el metabolismo del colesterol, resistencia a la insulina y el depósito de grasa a nivel abdominal en la edad adulta (Gardner et al., 2005, George et al., 2012, Khanal et al., 2016). De manera similar, en nuestro estudio los corderos machos restringidos durante la lactancia (Exp. I) presentaron menores concentraciones de insulina en esta fase y alteraciones metabólicas a largo plazo, una vez que se restauró la alimentación, tal y como lo reflejan las mayores concentraciones plasmáticas de colesterol y de lipoproteínas de alta y de baja densidad y la mayor

acumulación de grasa hepática al final de la fase de cebo (6,48 vs. 7.73 g/kg de materia seca para los corderos ADL y RES, respectivamente; $P=0,013$; (Santos et al., 2018c)). La alimentación restringida en etapas tempranas de la vida puede disminuir la secreción de insulina y modificar la actividad de esta hormona en los tejidos periféricos, para garantizar una adecuada absorción de glucosa en el cerebro y el corazón (Lizarraga-Mollinedo et al., 2012, Nurliyana et al., 2016). Este mecanismo, que asegura que la glucosa disponible se distribuya a los principales órganos, pudo haber inducido posteriormente el desarrollo de resistencia a la insulina. Sin embargo, no se observaron mayores concentraciones plasmáticas de insulina durante la fase de cebo en los corderos del grupo RES (Exp. I), probablemente debido a que las muestras se obtuvieron en ayunas. En todo caso, la resistencia a la insulina es compatible con la mayor acumulación de grasa (Angulo and Lindor, 2002) observada en el hígado de los corderos de cebo restringidos durante la lactancia (Exp. I). Todas estas alteraciones han podido contribuir a reducir la eficiencia alimentaria del grupo RES durante la fase de cebo.

El consumo de cantidades limitadas de lactorreemplazante en las corderas (Exp. II) no afectó a los niveles plasmáticos de insulina y disminuyó las concentraciones de colesterol y de lipoproteínas de baja densidad únicamente en la lactancia. En cambio, las menores concentraciones de gamma glutamil transferasa y albúmina detectadas en el grupo RES durante la lactancia, persistieron varios meses después de que finalizase la restricción (Exp. II), sugiriendo que la función hepática pudo verse afectada a largo plazo. En los dos experimentos, por tanto, se encontraron alteraciones a largo plazo, aunque cabe destacar que no se vieron afectados los mismos parámetros bioquímicos, probablemente debido a que las diferencias entre los dos estudios (el sexo de los corderos y la alimentación recibida después de la restricción) han podido condicionar los efectos de la programación metabólica (Owens et al., 2007, Poore et al., 2007, Kongsted et al., 2014, Poore et al.,

2014, Khanal et al., 2016). Las corderas (Exp. II) se alimentaron durante la recría con una ración más rica en fibra y menos energética que la que recibieron los machos en la fase de cebo (Exp. I), de forma que pudieron ser menos susceptibles a padecer alteraciones relacionadas con el metabolismo energético.

Parámetros bioquímicos indicadores de inflamación

La concentración plasmática de ceruloplasmina (una APP+) fue significativamente mayor en los corderos del grupo RES tanto en la lactancia como en la fase de cebo (Exp. I), sugiriendo que la restricción temprana de alimento pudo contribuir al desarrollo y mantenimiento de una respuesta inflamatoria a nivel sistémico (Bertoni and Trevisi, 2013). El aumento en la fase de cebo de las concentraciones de la SOD, que tiene propiedades antiinflamatorias, y de colesterol, cuya acumulación intracelular promueve la respuesta inflamatoria (Tall and Yvan-Charvet, 2015), también apunta a que estos animales padecieron una inflamación persistente. En las corderas con acceso restringido a lactorreemplazante (Exp. II), aunque la concentración de ceruloplasmina fue numéricamente mayor que la del grupo ADL tanto en la lactancia como en la recría, la diferencia no fue estadísticamente significativa, pudiendo deberse a las diferentes condiciones de restricción de alimento durante la lactancia y a la distinta ración recibida después del destete. Como se mencionó con anterioridad, la dieta posdestete del Exp. II presentaba una menor proporción de concentrado, y, por tanto, era menos proclive a causar alteraciones metabólicas como la acidosis ruminal en las corderas. Schäff et al. (2016) y Gerbert et al. (2018) también detectaron una mayor concentración plasmática de fibrinógeno (otra APP+) en terneros durante la fase de lactancia restringida, aunque este efecto desapareció una vez que los animales recibieron la misma cantidad de lactorreemplazante que el grupo ADL. Es posible que esta discrepancia con nuestros resultados se deba a que la adaptación al destete tuvo una duración mayor en los estudios

anteriormente citados, induciendo menos estrés a los animales y una menor elevación de las APP+ (Kim et al., 2011).

Parámetros bioquímicos indicadores de estrés oxidativo

Durante la fase de lactancia, los corderos machos restringidos (Exp. I) presentaron una menor concentración plasmática de bilirrubina, que tiene propiedades antioxidantes (Jansen and Daiber, 2012). Igualmente, las concentraciones plasmáticas de antioxidantes como la albúmina (Moran et al., 2001), la paraoxonasa (Ece et al., 2007), así como la capacidad antioxidante total (Benzie and Strain, 1996), fueron más bajas en las corderas lactantes restringidas (Exp. II). Una plausible interpretación de estos resultados es que la menor ingestión de leche en los corderos restringidos de ambos experimentos pudo generar menos especies reactivas y, por tanto, requirieron menos antioxidantes para neutralizarlas que los animales alimentados *ad libitum*. De hecho, los valores numéricamente más bajos de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) detectados en el hígado de las corderas lactantes del grupo RES (2,63 vs. 2,22 μg de MDA / g de muestra para las corderas ADL y RES del Exp. II, respectivamente; $P > 0,05$; Santos et al., 2018b) indican que la restricción temprana de alimento pudo asociarse con una disminución en la peroxidación lipídica durante la fase de lactancia. No obstante, en niños desnutridos (Ece et al., 2007) y en ratas con alimentación restringida durante la lactancia (Fetoui et al., 2009, dos Santos-Junior et al., 2016) la reducción en los niveles de las defensas antioxidantes se ha vinculado con un aumento en las concentraciones de peróxidos y estrés oxidativo. Esta discordancia con los resultados del Exp. II puede deberse a diferencias entre las corderas, las ratas y los niños en la capacidad que tuvieron de movilizar grasas de las reservas durante la restricción de alimento. En las corderas, como hemos comentado anteriormente, el catabolismo lipídico se hallaba limitado tras un mes de restricción alimentaria (Exp. II), mientras que los niños desnutridos pudieron

catabolizar y oxidar más grasa porque presentaban una concentración plasmática de triglicéridos más elevada que el grupo control (Ece et al., 2007).

Por otra parte, hay que mencionar que en el periodo de cebo (Exp. I) se observaron mayores concentraciones de SOD y menores niveles de bilirrubina en el grupo RES, sugiriendo que la restricción temprana de alimento pudo promover desequilibrios a largo plazo en las defensas antioxidantes. Coincidiendo con nuestros resultados, He et al. (2012) describieron una mayor actividad de la SOD y una menor actividad de la catalasa en el timo de cabritos que, después de haber estado restringidos en el útero, habían sido realimentados durante varias semanas. Estos cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes pueden aparecer como consecuencia de la disfunción mitocondrial que induce la restricción temprana de alimento (Simmons et al., 2005). Además, la alimentación restringida durante la lactancia afectó al metabolismo lipídico a nivel hepático en la fase de cebo (Exp. I), tal y como indican la disminución en la expresión de genes involucrados en la β -oxidación de ácidos grasos (Santos et al., 2018a) y la mayor acumulación de grasa observada en el hígado. Los menores valores de TBARS hallados durante la fase de cebo en los corderos del grupo RES (Exp. I) sugieren que la peroxidación lipídica se encuentra disminuida como consecuencia de un menor catabolismo de las grasas. No obstante, a diferencia de lo que observamos en el Exp. I, la ingestión de cantidades limitadas de lactorreemplazante no afectó a las concentraciones plasmáticas de antioxidantes en la fase de recría (Exp. II), probablemente debido a que las corderas se alimentaron en este periodo con una dieta menos energética que los corderos de cebo (Exp. I), lo que provocó que estos animales estuviesen expuestos a un menor estrés metabólico y oxidativo.

Parámetros ruminales

La ausencia de cambios en la microbiota epimural del rumen en los corderos de cebo (Exp. I) que habían estado restringidos en la lactancia en comparación con el grupo ADL indica que la restricción temprana de alimento no afectó a la colonización microbiana de la mucosa ruminal (Steele et al., 2009). Además, no se observaron diferencias entre los dos grupos en las proporciones de ácidos grasos volátiles, el color de la mucosa ruminal, los parámetros morfométricos de las papilas ni en la expresión local de TLRs y citoquinas, lo que sugiere que la restricción durante la lactancia no afectó al desarrollo posterior de acidosis ruminal en la fase de cebo. Por tanto, de acuerdo con nuestros resultados, las alteraciones descritas en los apartados anteriores se establecerían en los corderos restringidos durante la lactancia con independencia de la instauración de la acidosis ruminal.

Referencias

- AMADI, B., FAGBEMI, A. O., KELLY, P., MWIYA, M., TORRENTE, F., SALVESTRINI, C., DAY, R., GOLDEN, M. H., EKLUND, E. A., FREEZE, H. H. & MURCH, S. H. 2009. Reduced production of sulfated glycosaminoglycans occurs in Zambian children with kwashiorkor but not marasmus. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 592-600.
- ANGULO, P. & LINDOR, K. D. 2002. Non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17, S186-S190.
- BALLOU, M. A., HANSON, D. L., COBB, C. J., OBEIDAT, B. S., SELLERS, M. D., PEPPER-YOWELL, A. R., CARROLL, J. A., EARLEYWINE, T. J. & LAWHON, S. D. 2015. Plane of nutrition influences the performance, innate leukocyte responses, and resistance to an oral *Salmonella enterica* serotype Typhimurium challenge in Jersey calves. *Journal of Dairy Science*, 98, 1972-1982.
- BEATTY, D. W., NAPIER, B., SINCLAIRSMITH, C. C., MCCABE, K. & HUGHES, E. J. 1983. SECRETORY IGA SYNTHESIS IN KWASHIORKOR. *Journal of Clinical & Laboratory Immunology*, 12, 31-36.
- BENZIE, I. F. F. & STRAIN, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- BERTONI, G. & TREVISI, E. 2013. Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy herds. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 29, 413-431.
- BOURKE, C. D., BERKLEY, J. A. & PRENDERGAST, A. J. 2016. Immune dysfunction as a cause and consequence of malnutrition. *Trends in Immunology*, 37, 386-398.

- CALDEIRA, R. M., BELO, A. T., SANTOS, C. C., VAZQUES, M. I. & PORTUGAL, A. V. 2007. The effect of long-term feed restriction and over-nutrition on body condition score, blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Ruminant Research*, 68, 242-255.
- CAMPBELL, D. I., MURCH, S. H., ELIA, M., SULLIVAN, P. B., SANYANG, M. S., JOBARTEH, B. & LUNN, P. G. 2003. Chronic T cell-mediated enteropathy in rural west African children: Relationship with nutritional status and small bowel function. *Pediatric Research*, 54, 306-311.
- CARBERRY, C. A., KENNY, D. A., SUKKYAN, H., 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, 4949-4958.
- CERUTTI, A. & RESCIGNO, M. 2008. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity*, 28, 740-750.
- COSTA, L. B., JOHNBULL, E. A., REEVES, J. T., SEVILLEJA, J. E., FREIRE, R. S., HOFFMAN, P. S., LIMA, A. A. M., ORIA, R. B., ROCHE, J. K., GUERRANT, R. L. & WARREN, C. A. 2011. Cryptosporidium-malnutrition interactions: mucosal disruption, cytokines, and TLR signaling in a weaned murine model. *Journal of Parasitology*, 97, 1113-1120.
- DA COSTA, T. B., GOMES DE MORAIS, N., DE LIRA, J. M. B., DE ALMEIDA, T. M., GOCALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. D., PEREIRA, V. R. A., CAVALCANTI, M. D. & DE CASTRO, C. 2017. Relation between neonatal malnutrition and gene expression: inflammasome function in infections caused by *Candida Albicans*. *European Journal of Nutrition*, 56, 693-704.
- DIAS, J., MARCONDES, M. I., DE SOUZA, S. M., DA MATA E SILVA, B. C., NORONHA, M. F., RESENDE, R. T., MACHADO, F. S., MANTOVANI, H. C., DILL-MCFARLAND, K. A. & SUEN, G. 2018. Bacterial community dynamics across the gastrointestinal tracts of dairy calves during preweaning development. *Applied and Environmental Microbiology*, 84, e02675-17.
- DOS SANTOS-JUNIOR, E. F., GONCALVES-PIMENTEL, C., DE ARAUJO, L. C. C., DA SILVA, T. G., DE MELO-JUNIOR, M. R., MOURA-NETO, V. & ANDRADE-DA-COSTA, B. L. D. S. 2016. Malnutrition increases NO production and induces changes in inflammatory and oxidative status in the distal colon of lactating rats. *Neurogastroenterology and Motility*, 28, 1204-1216.
- ECE, A., GURKAN, F., CELIK, F., BOSNAK, M., YEL, S., BALIK, H. & EREL, O. 2007. Paraoxonase, total antioxidant activity and peroxide levels in marasmic children: Relationships with leptin. *Clinical Biochemistry*, 40, 634-639.
- ELLISON, M. J., CONANT, G. C., LAMBERSON, W. R., COCKRUM, R. R., AUSTIN, K. J., RULE, D. C. & CAMMACK, K. M. 2017. Diet and feed efficiency status affect rumen microbial profiles of sheep. *Small Ruminant Research*, 156, 12-19.
- FETOUI, H., GAROUI, M. & ZEGHAL, N. 2009. Protein restriction in pregnant- and lactating rats-induced oxidative stress and hypohomocysteinaemia in their offspring. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 93, 263-270.
- FOCK, R. A., VINOLO, M. A., DE MOURA SA ROCHA, V., DE SA ROCHA, L. C. & BORELLI, P. 2007. Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-alpha in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. *Cytokine*, 40, 105-114.

- FRAYN, K. N., SUMMERS, L. K. & FIELDING, B. A. 1997. Regulation of the plasma non-esterified fatty acid concentration in the postprandial state. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 56, 713-721.
- FRIES, P. N., POPOWYCH, Y. I., GUAN, L. L. & GRIEBEL, P. J. 2011. Age-related changes in the distribution and frequency of myeloid and T cell populations in the small intestine of calves. *Cellular Immunology*, 271, 428-437.
- GARDNER, D. S., TINGEY, K., VAN BON, B. W. M., OZANNE, S. E., WILSON, V., DANDREA, J., KEISLER, D. H., STEPHENSON, T. & SYMONDS, M. E. 2005. Programming of glucose-insulin metabolism in adult sheep after maternal undernutrition. *American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 289, R947-R954.
- GEBERT, A., ROTHKOTTER, H. J. & PABST, R. 1994. Cytokeratin 18 is an M-cell marker in porcine Peyer's patches. *Cell and Tissue Research*, 276, 213-221.
- GEORGE, L. A., ZHANG, L., TUERSUNJIANG, N., MA, Y., LONG, N. M., UTHLAUT, A. B., SMITH, D. T., NATHANIELSZ, P. W. & FORD, S. P. 2012. Early maternal undernutrition programs increased feed intake, altered glucose metabolism and insulin secretion, and liver function in aged female offspring. *American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 302, R795-R804.
- GERBERT, C., FRIETEN, D., KOCH, C., DUSEL, G., EDER, K., STEFANIAK, T., BAJZERT, J., JAWOR, P., TUCHSCHERER, A. & HAMMON, H. M. 2018. Effects of *ad libitum* milk replacer feeding and butyrate supplementation on behavior, immune status, and health of Holstein calves in the postnatal period. *Journal of Dairy Science*, 101, 7348-7360.
- GIRÁLDEZ, F. J., FRUTOS, P., LAVÍN, P. & MANTECÓN, A. R. 1999. Body composition changes and energy retention in milk-fed lambs undergoing energy restriction. *Small Ruminant Research*, 31, 127-133.
- GOMES DE MORAIS, N., DA COSTA, T. B., BEZERRA DE LIRA, J. M., GONCALVES DE ALBUQUERQUE, S. D. C., ALVES PEREIRA, V. R., CAVALCANTI, M. D. P. & MACHADO BARBOSA DE CASTRO, C. M. 2017. TLR and NLRP3 inflammasome expression deregulation in macrophages of adult rats subjected to neonatal malnutrition and infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nutrition*, 33, 174-180.
- HE, Z. X., SUN, Z. H., TAN, Z. L., TANG, S. X., ZHOU, C. S., HAN, X. F., WANG, M., WU, D. Q., KANG, J. H. & BEAUCHEMIN, K. A. 2012. Effects of maternal protein or energy restriction during late gestation on antioxidant status of plasma and immune tissues in postnatal goats. *Journal of Animal Science*, 90, 4319-4326.
- JAMI, E., ISRAEL, A., KOTSER, A. & MIZRAHI, I. 2013. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The ISME Journal*, 7, 1069-1079.
- JANSEN, T. & DAIBER, A. 2012. Direct antioxidant properties of bilirubin and biliverdin. Is there a role for biliverdin reductase? *Frontiers in Pharmacology*, 3, 30.
- JELIC, K., HALLGREEN, C. E. & COLDING-JØRGENSEN, M. 2009. A model of NEFA dynamics with focus on the postprandial state. *Annals of Biomedical Engineering*, 37, 1897-1909.
- KAUFHOLD, J. N., HAMMON, H. M., BRUCKMAIER, R. M., BREIER, B.H. & BLUM, J.W. 2000. Postprandial metabolism and endocrine status in veal calves fed at different frequencies. *Journal of Dairy Science*, 83, 2480-2490.
- KELLY, D. & COUTTS, A. G. P. 2000. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. *Proceedings of the Nutrition Society*, 59, 177-185.

- KHANAL, P., JOHNSEN, L., AXEL, A. M. D., HANSEN, P. W., KONGSTED, A. H., LYCKEGAARD, N. B. & NIELSEN, M. O. 2016. Long-term impacts of foetal malnutrition followed by early postnatal obesity on fat distribution pattern and metabolic adaptability in adult sheep. *PLoS One*, 11, e0156700.
- KIM, M. H., YANG, J. Y., UPADHAYA, S. D., LEE, H. J., YUN, C. H. & HA, J. K. 2011. The stress of weaning influences serum levels of acute-phase proteins, iron-binding proteins, inflammatory cytokines, cortisol, and leukocyte subsets in Holstein calves. *Journal of Veterinary Science*, 12, 151-157.
- KOBAYASHI, A., DONALDSON, D. S., ERRIDGE, C., KANAYA, T., WILLIAMS, I. R., OHNO, H., MAHAJAN, A. & MABBOTT, N. A. 2013. The functional maturation of M cells is dramatically reduced in the Peyer's patches of aged mice. *Mucosal Immunology*, 6, 1027-1037.
- KONGSTED, A. H., TYGESEN, M. P., HUSTED, S. V., OLIVER, M. H., TOLVER, A., CHRISTENSEN, V. G., NIELSEN, J. H. & NIELSEN, M. O. 2014. Programming of glucose-insulin homeostasis: long-term consequences of pre-natal versus early post-natal nutrition insults. Evidence from a sheep model. *Acta Physiologica*, 210, 84-98.
- LARA-PADILLA, E., CAMPOS-RODRÍGUEZ, R., JARILLO-LUNA, A., REYNA-GARFIAS, H., RIVERA-AGUILAR, V., MILIAR, A., BERRAL DE LA ROSA, F. J., NAVAS, P. & LÓPEZ-LLUCH, G. 2011. Caloric restriction reduces IgA levels and modifies cytokine mRNA expression in mouse small intestine. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22, 560-566.
- LARSEN, J. M. 2017. The immune response to Prevotella bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*, 151, 363-374.
- LEE, S.-H., JUN, H.-K., LEE, H.-R., CHUNG, C.-P. & CHOI, B.-K. 2010. Antibacterial and lipopolysaccharide (LPS)-neutralising activity of human cationic antimicrobial peptides against periodontopathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, 138-145.
- LEY, R. E. 2016. Prevotella in the gut: choose carefully. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 13, 69-70.
- LIZARRAGA-MOLLINEDO, E., FERNÁNDEZ-MILLÁN, E., DE TORO MARTÍN, J., MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C., ESCRIVÁ, F. & ÁLVAREZ, C. 2012. Early undernutrition induces glucagon resistance and insulin hypersensitivity in the liver of suckling rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 302, E1070-E1077.
- LUKENS, J. R., GURUNG, P., VOGEL, P., JOHNSON, G. R., CARTER, R. A., MCGOLDRICK, D. J., BANDI, S. R., CALABRESE, C. R., VANDE WALLE, L., LAMKANFI, M. & KANNEGANTI, T.-D. 2014. Dietary modulation of the microbiome affects autoinflammatory disease. *Nature*, 516, 246-249.
- MACCARI, P., WIEDEMANN, S., KUNZ, H. J., PIECHOTTA, M., SANFTLEBEN, P. & KASKE, M. 2015. Effects of two different rearing protocols for Holstein bull calves in the first 3 weeks of life on health status, metabolism and subsequent performance. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99, 737-746.
- MALMUTHUGE, N., LI, M., FRIES, P., GRIEBEL, P. J. & GUAN, L. L. 2012. Regional and age dependent changes in gene expression of Toll-like receptors and key antimicrobial defence molecules throughout the gastrointestinal tract of dairy calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 146, 18-26.

- MCCANN, J. C., WILEY, L. M., FORBES, T. D., ROUQUETTE, F. M., JR. & TEDESCHI, L. O. 2014. Relationship between the rumen microbiome and residual feed intake-efficiency of Brahman bulls stocked on bermudagrass pastures. *PLoS One*, 9, e91864.
- MOALLEM, U., WERNER, D., LEHRER, H., ZACHUT, M., LIVSHITZ, L., YAKOBY, S. & SHAMAY, A. 2010. Long-term effects of *ad libitum* whole milk prior to weaning and prepubertal protein supplementation on skeletal growth rate and first-lactation milk production. *Journal of Dairy Science*, 93, 2639-2650.
- MORAN, L. K., GUTTERIDGE, J. M. C. & QUINLAN, G. J. 2001. Thiols in cellular redox signalling and control. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 763-772.
- MYER, P. R., WELLS, J. E., SMITH, T. P. L., KUEHN, L. A. & FREETLY, H. C. 2015. Microbial community profiles of the colon from steers differing in feed efficiency. *Springerplus*, 4, 454.
- NAYAK, B. N., FRIEL, J. K., REMPEL, C. B. & JONES, P. J. H. 2009. Energy-restricted diets result in higher numbers of CD4⁺, CD8⁺, immunoglobulins (A, M, and G), and CD45RA cells in spleen and CD4⁺, immunoglobulin A, and CD45RA cells in colonic lamina propria of rats. *Nutrition Research*, 29, 487-493.
- 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.
- OWENS, J. A., THAVANESWARAN, P., DE BLASIO, M. J., MCMILLEN, I. C., ROBINSON, J. S. & GATFORD, K. L. 2007. Sex-specific effects of placental restriction on components of the metabolic syndrome in young adult sheep. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 292, E1879-E1889.
- POORE, K. R., CLEAL, J. K., NEWMAN, J. P., BOULLIN, J. P., NOAKES, D. E., HANSON, M. A. & GREEN, L. R. 2007. Nutritional challenges during development induce sex-specific changes in glucose homeostasis in the adult sheep. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 292, E32-E39.
- POORE, K. R., HOLLIS, L. J., MURRAY, R. J. S., WARLOW, A., BREWIN, A., FULFORD, L., CLEAL, J. K., LILLYCROP, K. A., BURDGE, G. C., HANSON, M. A. & GREEN, L. R. 2014. Differential pathways to adult metabolic dysfunction following poor nutrition at two critical developmental periods in sheep. *PLoS One*, 9, e90994.
- PREIDIS, G. A., AJAMI, N. J., WONG, M. C., BESSARD, B. C., CONNER, M. E. & PETROSINO, J. F. 2015. Composition and function of the undernourished neonatal mouse intestinal microbiome. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26, 1050-1057.
- PRIMS, S., PINTENS, N., VERGAUWEN, H., VAN CRUCHTEN, S., VAN GINNEKEN, C. & CASTELEYN, C. 2017. Effect of artificial rearing of piglets on the volume densities of M cells in the tonsils of the soft palate and ileal Peyer's patches. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 184, 1-7.
- REYNA-GARFIAS, H., MILIAR, A., JARILLO-LUNA, A., RIVERA-AGUILAR, V., PACHECO-YEPEZ, J., BAEZA, I. & CAMPOS-RODRÍGUEZ, R. 2010. Repeated restraint stress increases IgA concentration in rat small intestine. *Brain Behavior and Immunity*, 24, 110-118.
- REYNOLDS, J. D. & MORRIS, B. 1983. The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *European Journal of Immunology*, 13, 627-635.
- RHO, S., KIM, H., SHIM, S. H., LEE, S. Y., KIM, M. J., YANG, B.-G., JANG, M. H., HAIL, B. W., SONG, M. K., CZERKINSKY, C. & KIM, J.-O. 2017. Protein energy malnutrition alters mucosal IgA responses and reduces mucosal vaccine efficacy in mice. *Immunology Letters*, 190, 247-256.

- RIOS, D., WOOD, M. B., LI, J., CHASSAING, B., GEWIRTZ, A. T. & WILLIAMS, I. R. 2016. Antigen sampling by intestinal M cells is the principal pathway initiating mucosal IgA production to commensal enteric bacteria. *Mucosal Immunology*, 9, 907-916.
- RYTTER, M. J. H., KOLTE, L., BRIEND, A., FRIIS, H. & CHRISTENSEN, V. B. 2014. The immune system in children with malnutrition-A systematic review. *PLoS One*, 9, e105017.
- SANTOS, A., GIRÁLDEZ, F. J., TREVISI, E., LUCINI, L., FRUTOS, J. & ANDRÉS, S. 2018a. Liver transcriptomic and plasma metabolomic profiles of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period. *Journal of Animal Science*, 96, 1495-1507.
- SANTOS, A., GIRÁLDEZ, F. J., VALDÉS, C., TREVISI, E., LUCINI, L., FRUTOS, J. & ANDRÉS, S. 2018b. Milk replacer restriction during early life impairs the live body weight and progesterone patterns of ewe lambs during the replacement period. *Journal of Dairy Science*, 101, 8021-8031.
- SANTOS, A., VALDÉS, C., GIRÁLDEZ, F. J., LÓPEZ, S., FRANCE, J., FRUTOS, J., FERNÁNDEZ, M. & ANDRÉS, S. 2018c. Feed efficiency and the liver proteome of fattening lambs are modified by feed restriction during the suckling period. *Animal* 12, 1838-1846.
- SCHÄFF, C. T., GRUSE, J., MACIEJ, J., MIELENZ, M., WIRTHGEN, E., HOEFLICH, A., SCHMICKE, M., PFUHL, R., JAWOR, P., STEFANIAK, T. & HAMMON, H. M. 2016. Effects of feeding milk replacer *ad libitum* or in restricted amounts for the first five weeks of life on the growth, metabolic adaptation, and immune status of newborn calves. *PLoS One*, 11, e0168974.
- SIMMONS, R. A., SUPONITSKY-KROYTER, I. & SELAK, M. A. 2005. Progressive accumulation of mitochondrial DNA mutations and decline in mitochondrial function lead to beta-cell failure. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 28785-28791.
- SONG, Y., MALMUTHUGE, N., STEELE, M. A. & GUAN, L. L. 2018. Shift of hindgut microbiota and microbial short chain fatty acids profiles in dairy calves from birth to pre-weaning. *FEMS Microbiology Ecology*, 94, fix179.
- STEELE, M. A., ALZAHAL, O., HOOK, S. E., CROOM, J. & MCBRIDE, B. W. 2009. Ruminal acidosis and the rapid onset of ruminal parakeratosis in a mature dairy cow: a case report. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51, 39.
- SUN, D. X., MUTHUKUMAR, A. R., LAWRENCE, R. A. & FERNANDES, G. 2001. Effects of calorie restriction on polymicrobial peritonitis induced by cecum ligation and puncture in young C57BL/6 mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8, 1003-1011.
- TALL, A. R. & YVAN-CHARVET, L. 2015. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 15, 104-116.
- UYENO, Y., SHIGEMORI, S. & SHIMOSATO, T. 2015. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. *Microbes and Environments*, 30, 126-132.
- VILLENA, J., ASO, H. & KITAZAWA, H. 2014. Regulation of toll-like receptors-mediated inflammation by immunobiotics in bovine intestinal epitheliocytes: role of signaling pathways and negative regulators. *Frontiers in Immunology*, 5, 421.
- YEOMAN, C. J., ISHAQ, S. L., BICHI, E., OLIVO, S. K., LOWE, J. & ALDRIDGE, B. M. 2018. Biogeographical differences in the influence of maternal microbial sources on the early successional development of the bovine neonatal gastrointestinal tract. *Scientific Reports*, 8, 3197.
- ZHANG, G. L. & GHOSH, S. 2002. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 7059-7065.

CONCLUSIONES

- 1- La restricción alimentaria en corderos durante la fase de lactancia modifica la comunidad bacteriana epimural del íleon y la respuesta inmunitaria local hacia un perfil proinflamatorio en el periodo de cebo. Estos cambios pueden ser una de las causas subyacentes a la menor eficiencia alimentaria durante el periodo de cebo de los animales restringidos en la lactancia.
- 2- La restricción alimentaria durante la fase de lactancia no induce cambios en la microbiota epimural del rumen ni en la susceptibilidad de los corderos a desarrollar acidosis ruminal en el periodo de cebo.
- 3- La alimentación restringida en corderos lactantes promueve la aparición de alteraciones metabólicas en el periodo de cebo, principalmente relacionadas con el metabolismo lipídico y la acumulación de grasa visceral. Estas alteraciones pueden contribuir a reducir la eficiencia alimentaria de los corderos durante el periodo de engorde.
- 4- La alimentación restringida en corderos lactantes provoca una modificación de la comunidad bacteriana epimural del colon que es detectable durante el periodo de cebo sin que se vean afectados los parámetros inmunitarios locales.
- 5- La ingestión de cantidades restringidas de lactorreemplazante en corderas favorece el desarrollo de una respuesta inmunitaria proinflamatoria en el íleon durante el periodo de restricción y afecta persistentemente a la función hepática durante el periodo de recría, incluso con posterioridad a que se haya restaurado la alimentación.
- 6- La ingestión restringida de lactorreemplazante en corderas promueve el desarrollo de una respuesta antiinflamatoria en el colon durante el periodo de restricción sin que se vea afectada la comunidad bacteriana epimural a este nivel.

