



TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA
REGULACIÓN DEL CONSUMO EN VACAS
DE CRÍAS SOMETIDAS A DOS OFERTAS DE
FORRAJE DE CAMPO NATIVO**

M^a Victoria Bassaiztégy Ures

Orientadora: MSc. Ing. Agr. Ana Inés Trujillo Lezama, Profesora Adj.
Nutrición Animal, Dpto. Producción Animal y Pasturas, Facultad de
Agronomía.

Tribunal: Dra. Graciela Garcia, Dra. Ing. Agr. Mariana Carriquiri, Msc.
Ing. Agr. Ana Inés Trujillo.

Julio 2012

SUMARIO

I. INTRODUCCIÓN.....	4
II. ANTECEDENTES	6
II.1. Consumo y su Regulación en Rumiantes	6
II.2. Mecanismos Neurohormonales en la Regulación del Consumo.....	7
II.3. Regulación Central del Consumo.....	8
II.3.a. Péptidos orexigénicos.	9
II.3.b. Neuropeptidos anorexigénicos.	10
II.4. Regulación Periférica de la Ingesta.....	11
II.5. Cambios en los Niveles de Transcritos de Factores Orexigénicos y Anorexigénicos Frente a Situaciones de Déficit Energético.....	15
III. HIPÓTESIS	17
IV. OBJETIVOS.....	17
IV.1. Objetivo General.....	17
IV.2. Objetivos Específicos	17
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
V.1. Descripción General del Experimento	18
V.2. Extracción de ARN	20
V.3. Tratamiento con ADNasas	20
V.4. Retrotranscripción.....	20
V.5. Amplificación	21
V.5. a. Diseño de cebadores.	21
V.5. b. PCR en tiempo real.....	22
V.6. Cuantificación de ARNm.....	24
V.7. Cálculo de Eficiencia	27
V.8. Análisis Estadístico	27
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
VI.1. Extracción del ARNm	28
VI.2. Especificidad de los Cebadores Empleados y Producto Amplificado.....	29
VI.3. Eficiencias de Amplificación.....	31
VI.4. Amplificación de ARNm.....	32

VI.5. Expresión Relativa de ARNm en Hipotálamo y Abomaso	33
VII. CONCLUSIONES.....	39
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	40
XIII. ANEXOS.....	55
ANEXO I. Listado de Animales Utilizados en Este Estudio.....	55
ANEXO II. Protocolo de Extracción de ARN Total	56
ANEXO III. Precipitación con Cloruro de Litio.....	57
ANEXO IV. Protocolo de tratamiento con desoxirribonucleasas	58
ANEXO V. Protocolo de retrotranscripción.....	59
ANEXO VI. Abstract Presentado en la Reunión Anual Conjunta ADSA®	60
ANEXO VII. Imagen de poster presentado en la Reunión Anual Conjunta ADSA®	61

I. INTRODUCCIÓN

En Uruguay la ganadería de carne vacuna se lleva a cabo en ecosistemas pastoriles donde el campo nativo constituye el principal recurso forrajero empleado. A pesar de que la gran expansión de la agricultura ha relegado este sistema de producción hacia tierras marginales de bajo potencial productivo (Arbeletche & Cividanes, 2011), la competitividad del sector exportador de carne sigue dependiendo del resultado físico-económico de la cría vacuna en pastizal nativo, el cual hoy día ocupa un área de 8 a 10 millones de hectáreas.

Este proceso de cría se lleva a cabo bajo pastoreo directo de campo natural, caracterizado por grandes variaciones estacionales dentro y entre años tanto en la cantidad como en la calidad del forraje ofertado (Beretta, 1994). La baja producción de forraje invernal y de inicios de primavera, coincide con el momento fisiológico en el que el rodeo incrementa sus demandas de energía (gestación tardía y lactancia temprana). La disminución de consumo de materia seca es uno de los mayores cambios fisiológicos que sufren los animales durante estas etapas. Las vacas transitan por períodos de balance energético negativo (BEN) que determina la movilización de reservas corporales. Estas inciden directamente en la prolongación del anestro posparto, afectando la performance reproductiva, principal limitante de nuestros sistemas de cría (Pérez-Clariget *et al.*, 2007; Soca *et al.*, 2007).

Antecedentes nacionales han demostrado que las vacas de cría frente a distintas ofertas de forraje de campo natural a lo largo del año, responden de diferente forma en su balance energético. Esto se ve reflejado en su condición corporal (Soca *et al.*, 2008) y en sus perfiles metabólicos y hormonales (Laporta *et al.*, 2010). Asimismo, estas ofertas se han asociado con cambios en la conducta de pastoreo temporal y espacial (Scarlatto *et al.*, 2011a y b), con cambios en la composición corporal (Arambarri *et al.*, 2010) con cambios en el peso de las vísceras (Carriquiry *et al.*, 2010) y con mejoras en las respuestas reproductivas (Viñoles *et al.*, 2010; Carriquiry *et al.*, 2011).

El proceso de regulación de la ingesta es altamente complejo e involucra diferentes señales hormonales, metabólicas y neuronales, que son integradas a nivel hipotalámico, dando una respuesta de aumento o bien de disminución del consumo. El estudio de cambios en la expresión génica de estos factores claves, puede aportar

información sobre cómo los rumiantes logran atravesar periodos de BEN. Sin embargo, aún no se posee un conocimiento adecuado de cómo se modifica la expresión de genes involucrados en la regulación del consumo y del BEN en bovinos. La mayoría de la información científica relacionada con los efectos de subnutriciones sobre cambios en la expresión de ARNm de genes con efectos orexigénicos (potenciadores del consumo) y/o anorexigénicos (supresores del consumo), ha sido generada en roedores (Marks *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1999) y más recientemente en peces (Silverstein & Plisetskaya, 2000; Narnaware & Peter, 2001a y b; MacDonald & Volkoff, 2009), siendo muy limitada la generada en rumiantes y particularmente en bovinos. Por esto último, y dado el gran impacto que la cría de ganado vacuno tiene en la economía de nuestro país, y el lugar que ocupan nuestros campos nativos como insumo de bajo costo relativo en la actividad de cría vacuna, se justifica el estudio de esta problemática.

II. ANTECEDENTES

II.1. Consumo y su Regulación en Rumiantes

En los herbívoros, el consumo de nutrientes es el resultado de la expresión de su potencial de consumo y de la capacidad de selección de su dieta. La selección del forraje y su comportamiento o estrategia ingestiva dependen de la interacción entre las características del animal (morfo-fisiológicas, nutricionales y metabólicas, entre otras), las características de la vegetación (disponibilidad de forraje, estructura, valor nutricional y palatabilidad, entre otras) y las características del ambiente (Chilliard *et al.*, 2000).

Los estímulos físicos y metabólicos son los factores dominantes que controlan el consumo de forraje en animales estabulados. Los experimentos en producción animal han mostrado que la ingesta de forraje de baja digestibilidad está afectada por la capacidad del rumen y la tasa de pasaje, determinando un incremento en el consumo al aumentar la digestibilidad del forraje. Por otra parte, en condiciones de alimentos de alta digestibilidad, el consumo es función de los requerimientos energéticos del animal, disminuyendo al incrementarse la digestibilidad del alimento. La capacidad del rumen está directamente correlacionada con el peso corporal, mientras que los requerimientos energéticos se encuentran más relacionados con el peso metabólico (peso elevado a 0.75) (Galli *et al.*, 1996).

En condiciones de pastoreo, adquieren también importancia aquellos factores relacionados al comportamiento ingestivo, como la incapacidad del animal para mantener una alta tasa de consumo en el caso de condiciones limitantes de la pastura o el aumento del tiempo de pastoreo para compensar los efectos de una tasa de consumo reducida (Galli *et al.*, 1996).

Se han propuesto varios modelos que apuntan a determinar un factor principal en la regulación del consumo en los rumiantes. Algunas teorías explican el proceso a través del llenado físico, de la distensión del retículo rumen (Allen, 1996) y de la concentración de fibra detergente neutro (FDN) del forraje (Mertens, 1994). Otras, lo explican por factores metabólicos de retroalimentación o regulación fisiológica del consumo (Illius & Jessop, 1996; Mertens, 1994) y un tercer modelo de la regulación del consumo en rumiantes se basa en la relación costo-beneficio medida a través del consumo de oxígeno (Ketelaars & Tolkamp, 1996). Adicionalmente, Allen *et al.*, (2009)

proponen al proceso de oxidación hepática (HOT del inglés *hepatic oxidation theory*) como modelo unificador para explicar la respuesta en el consumo frente a cambios en la digestión y metabolismo de los nutrientes.

Estas propuestas intentan explicar la regulación del consumo por medio de un factor determinante y bajo determinadas condiciones, pero en realidad, el consumo se encuentra ajustado a un gran número de elementos y a la interacción de éstos. Por lo tanto, se postula que la regulación del consumo es multifactorial y aditiva. La Teoría del Mínimo Discomfort propuesta por Forbes & Provenza, (2000), en la cual el animal toma decisiones según modificaciones de su comportamiento ingestivo (incorporando factores sensoriales y psicológicos) con el fin de consumir una cantidad óptima y balanceada de nutrientes evitando excesos o deficiencias, ha cobrado también importancia en la temática de regulación del consumo en rumiantes.

II.2. Mecanismos Neurohormonales en la Regulación del Consumo

El consumo de energía en los animales vertebrados es un mecanismo altamente complejo producto de la integración de diferentes señales centrales y periféricas relacionadas con el hambre y la saciedad (Roche *et al.*, 2008a). Asimismo estas señales pueden ser divididas en señales de corto y largo plazo.

El conjunto de señales a corto plazo, (ej. de comida a comida) involucra señales hormonales originadas principalmente en el intestino, páncreas e hígado, en respuesta al contenido específico de nutrientes y a la presencia de estos en el tracto gastrointestinal (TGI). Actúan primariamente como determinantes de la saciedad y a efectos de limitar la cuantía de cada ingesta. La hormona ghrelina (GHRL) estimuladora del consumo y la hormona colecistoquinina (CCK) inhibidora del consumo, son dos señales producidas por el TGI que actúan rápidamente y provocan cambios en el balance de energía a corto término.

La regulación a largo plazo es llevada a cabo en proporción a las reservas energéticas y a la cantidad de energía consumida en periodos prolongados de tiempo. Esta regulación se encuentra mediada principalmente por el tejido adiposo y hormonas como la leptina e insulina, quienes son responsables de controlar el almacenamiento de energía de los animales.

Las diferentes señales de corto y largo plazo se interconectan entre sí cuando convergen en el hipotálamo el cual finalmente regula la ingesta y el gasto calórico para asegurar la homeostasis energética. En la tabla 1 se presentan los principales péptidos que intervienen en la regulación del consumo clasificados en centrales y periféricos y según su función (Sarika, 2006).

Tabla 1. Péptidos de mayor participación en el control del apetito. Tomado y modificado de Sarika (2006).

Péptidos	Orexigénicos	Anorexigénicos
Centrales	1. Neuropeptido Y	1. Transcripto regulado por cocaína y anfetaminas (CART)
	2. Hormona concentradora de melanocitos (MCH)	2. Melanocortinas (POMC)
	3. Orexinas/ hipocretinas	3. Péptido similar al glucagón
	4. Péptidos similar al Agouti (AgRP)	4. Factor liberador de corticotropinas
	5. Galanina	5. Insulina
	6. Opioides endógenos	6. Serotonina
	7. Endocannabinoides	7. Neurotensina
Periféricos	1. Ghrelina	1. Peptido YY
		2. Colecistoquinina (CCK)
		3. Leptina
		4. Amilina
		5. Insulina
		6. Péptidos similares al glucagón
		7. Bombesina

II.3. Regulación Central del Consumo

La gestión de alimentos por el animal está controlada por mecanismos fisiológicos que llevan al animal a iniciar y finalizar el consumo en un momento dado. Es un aspecto multifactorial controlado por el hipotálamo y el consumo debe responder a la necesidades y requerimientos del estado fisiológico en que el animal se encuentra (crecimiento, lactación, gestación, movilización, otros). El hipotálamo es la principal región del sistema nervioso central donde se produce la integración de estas señales con el fin de coordinar los balances energéticos de los animales. En él, se encuentran varios núcleos interconectados que han sido señalados como centros de control del hambre y la saciedad: el núcleo arcuato (ARC), el núcleo paraventricular (PVN), el núcleo ventromedial (VMN), el núcleo dorsomedial (DMN) y el área hipotalámica lateral (LH) (Baile & McLaughlin, 1987).

Uno de los sitios más importantes en la regulación del consumo, es el ARC también conocido como el núcleo infundibular. Se encuentra localizado en la base media del hipotálamo, adyacente al tercer ventrículo y a la eminencia media (Roche *et al.*, 2008a). En él, se encuentran dos grupos neuronales funcionalmente opuestos, que juegan un rol crucial en el control de la ingesta alimentaria. Un grupo de neuronas produce el péptido Y (NPY) y el péptido relacionado-agouti, AgRP del inglés *Agouti related peptide* (Everitt & Hokfelt 1989; Wolak *et al.*, 2003; Ebling & Barret, 2008). Ambos son moléculas orexigénicas pues su activación promueve la ingesta.

El otro grupo de neuronas produce neuropéptidos hipotalámicos anorexígenos que afectan la conducta alimentaria de manera tal de suprimir o inhibir el apetito. Estos son; el péptido derivado de la pro-opiomelanocortina (POMC) y el transcritto regulado por cocaína y anfetamina (CART) (del inglés cocaine-anfetamine-regulated-transcript) (Kristensen *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 1998; Schwartz *et al.*, 2000).

Esta gran densidad de neuronas transmite sus señales a través de proyecciones primarias hacia otros núcleos hipotalámicos donde otros neuropéptidos involucrados en la regulación del balance energético son expresados y en conjunto con los primeros, controlan el apetito y la ingesta (Leibowitz & Wortley, 2004).

II.3.a. Péptidos orexigénicos.

El **Neuropéptido Y (NPY)** es un neurotransmisor de 36 aminoácidos, uno de los más abundantes en el cerebro (Allen *et al.*, 1983) localizado principalmente en el ARC, desde donde se prolongan fibras nerviosas al PVN, DMN, y LN, estableciendo un efecto estimulador de la ingesta. Se han identificado 5 receptores de NPY distribuidos en varias zonas hipotalámicas; Y1, Y2, Y3 Y4 y Y5.

Se ha descrito que administraciones centrales de NPY estimulan el consumo voluntario de animales incluyendo especies rumiantes (Miner *et al.*, 1989) y la expresión génica y los niveles de circulación del neuropéptido aumentan en respuesta a una restricción alimenticia y disminuyen en respuesta a un exceso (Archer *et al.*, 2002). Aún mas, existe evidencia que muestra que la expresión diferencial de su ARNm en las neuronas orexigénicas depende del nivel de la restricción alimenticia siendo mayor en situaciones de demandas metabólicas importantes como por ejemplo en las primeras semanas de lactación en ovejas, (Sorensen *et al.*, 2002).

El **péptido relacionado con agouti (AgRP)** es un neuropéptido de 132 aminoácidos el cual se co-expresa junto con el NPY en el ARC del hipotálamo (Archer *et al.*, 2000), aunque también se distribuye hacia otras regiones del SNC. Presenta una potente acción estimulante del apetito y de la ganancia de peso corporal cuando se administra en el SNC. La expresión de AgRP es regulada positivamente durante una restricción alimenticia (Archer *et al.*, 2004) y durante un BEN generado durante la lactación en ovejas (Sorensen *et al.*, 2002).

El AgRP es un antagonista competitivo reversible de la hormona estimulante de los melanocitos alfa (α -MSH) pues compite por el mismo sitio de unión en sus receptores tipo 3 y 4, MC3 y MC4 respectivamente. Bloquea la acción anorexigénica de esta hormona y por lo tanto estimula el apetito (Fong *et al.*, 1997; Ollmann *et al.*, 1997; Cone 2005). En rumiantes, Wagner *et al.*, (2004) registraron un aumento del consumo en ovinos alimentados *ad libitum* (a voluntad) (el cual no persistió por más de 12 horas) al administrar AgRP en el ventrículo lateral. En otros estudios fue observada una regulación positiva del ARNm de AgRP en ovejas crónicamente desnutridas (Henry *et al.*, 2001; Archer *et al.*, 2004, 2005; Relling *et al.*, 2009) y en carneros castrados sometidos a un ayuno de 4 días (Adam *et al.*, 2002). Además, en otro ensayo realizado por Wagner *et al.*, (2004) en el cual ovinos sufrieron 3 días de ayuno, se detectó (utilizando técnica de doble inmunohistoquímica tanto para AgRP como factor c-Fos) un aumento del número de neuronas AgRP positivas y de su activación.

II.3.b. Neuropéptidos anorexigénicos.

Al igual que los péptidos orexigénicos, los anorexigénicos se expresan mayormente en el ARC y también sus células proyectan prolongaciones nerviosas sobre otras áreas que participan en la homeostasis energética y en la regulación del consumo.

La **pro-opiomelanocortina (POMC)** es un polipéptido precursor de numerosas hormonas, incluyendo melanocortinas como la hormona estimulante de α -melanocitos (α -MSH). Las melanocortinas controlan el apetito al activar los receptores MC3R y MC4R en neuronas de segundo orden, localizadas en los otros núcleos hipotalámicos relacionados al control del hambre y la saciedad. Observaciones en modelos murinos en situaciones de alimentación restrictiva (Brady *et al.*, 1990) encontraron que luego de 5 días de ayuno, los niveles de ARNm de POMC en ratas se encontraban reducidos solamente un 24%.

En rumiantes, Sorensen *et al.* (2002) mostraron una regulación negativa de la expresión génica de POMC en el ARC de ovejas durante la lactancia, facilitando la hiperfagia asociada a tal período. No obstante, la gran mayoría de los trabajos sobre la expresión de POMC en situaciones de stress alimenticio en rumiantes no han reportado cambios (Henry *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2002; Archer *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2004; Relling *et al.*, 2009). Estos estudios realizados todos en ovinos consideraron diferentes restricciones alimenticias; algunos de corta duración (4 días de ayuno, Adam *et al.*, (2002)), otros de duración intermedia (4 semanas, Relling *et al.*, (2009)) y otros en los cuales se trabajó con pre-tratamientos diferenciales de condición corporal (mantenimiento, disminución e incremento de la misma) o de nivel de adiposidad (ovejas “flacas” vs “gordas”), (Henry *et al.*, 2000; Archer *et al.*, 2002).

El **transcripto regulado por cocaína y anfetamina (CART)** se co-expresa en las mismas neuronas que expresan POMC también en el ARC. Entre otras funciones, este péptido que actúa como neurotransmisor produce un efecto de inhibición en la ingesta impidiendo la secreción y el vaciado gástrico. En ovejas crónicamente alimentadas se encontró una reducción en la expresión de CART en varias regiones del hipotálamo incluido el ARC (Archer *et al.*, 2002) pero contradictoriamente con este estudio en los resultados recabados por Adam *et al.* (2002) no se encontró una disminución significativa en la expresión del transcripto de CART en ovinos en ayuno.

Actualmente no se cuenta con más trabajos sobre la expresión diferencial de este transcripto en situaciones de BEN en rumiantes.

II.4. Regulación Periférica de la Ingesta

El ARC se encuentra parcialmente excluido de la barrera hematoencefálica lo cual hace que se encuentre estratégicamente posicionado para una comunicación directa con señales periféricas (Grouselle *et al.*, 2008). Las hormonas provenientes del TGI y del tejido adiposo son transportadas por el torrente sanguíneo hasta el hipotálamo. En 1973, Gibbs *et al.*, propusieron que las señales generadas durante la digestión (factores de saciedad), incluyendo péptidos secretados por el TGI, proporcionan información al cerebro destinada a inhibir la ingesta y culminar la comida. En la actualidad, se conocen numerosas hormonas que originan respuestas anorexigénicas en el hipotálamo: GLP-1, (péptido similar al glucagón), colecistokinina (CCK), péptido tirosina tirosina (PYY), entre otras. Sin embargo, únicamente la ghrelina (GHRL), un péptido de 28

aminoácidos descubierto en 1999 por Kojima *et al.*, ha sido identificada como desencadenante de respuestas orexigénicas.

La **ghrelina** es producida principalmente por las células oxínticas del abomaso y secretada de manera pulsátil. La misma varía notablemente durante el día, aumentando bruscamente poco antes de cada ingesta, tanto en especies monogástricas como en rumiantes (Hayashida *et al.*, 2001; Sugino *et al.*, 2002a,b; Reynolds *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2010). Del mismo modo, como en otras especies, la administración exógena de GHRL en ovinos, además de incrementar la secreción de hormona de crecimiento, estimula el consumo y modifica el comportamiento ingestivo (Grouselle *et al.*, 2008). Esta respuesta resulta probablemente de la acción de la hormona la cual vía sanguínea o a través de aferencias vagales actúa sobre sus receptores localizados en el ARC (Grouselle *et al.*, 2008). Se ha demostrado en roedores y en humanos (Wang *et al.*, 2002; Von Oetinger, 2009) que mediante estas dos vías y mediante producción hipotalámica de la hormona, el consumo es modificado a través de la inducción de la expresión de NPY y de AgRP en el hipotálamo y de la inhibición de las neuronas productoras de POMC y CART.

La secreción de GHRL en rumiantes bajo restricción alimenticia también presenta un comportamiento particular y está poco entendido en estas especies. En vacas lecheras en ayuno, la infusión abomasal de caseína o aceite de soya redujo la concentración plasmática de GHRL (Relling *et al.*, 2010), aunque la disminución del consumo sólo se encontró con la infusión con aceite (Relling & Reynolds, 2008). En novillos (Wertz-Lutz *et al.*, 2008), vacas lecheras (Itoh *et al.*, 2006) y ovejas (Relling *et al.*, 2010) la concentración plasmática de GHRL se asoció inversamente al balance energético. Wertz-Lutz *et al.* (2006) infundieron GHRL endovenosa en novillos y observaron un aumento inmediato en el consumo, el cual no se prolongó durante el día. Pero Roche *et al.* (2008b) mediante infusiones subcutáneas de GHRL con dosis similares a la de Wertz-Lutz *et al.* (2006) y con el objetivo de encontrar respuestas más crónicas (semanas en lugar de horas), no encontraron diferencias en el consumo.

Las acciones promotoras de la ingesta mediadas por la hormona GHRL se contrarrestan con estímulos inhibitorios del consumo resultado de la distensión gástrica (mecánicos) ó resultado de la acción de otras hormonas del TGI como la **colecistokinina (CCK)**. Con respecto a esta hormona se han descrito varias formas moleculares que difieren en el número de aminoácidos (Reeve *et al.*, 2004): CCK-8,

CCK-33, CCK-39 y CCK-58. La ingestión de nutrientes, fundamentalmente grasas y proteínas, induce la liberación de CCK al torrente sanguíneo actuando localmente, estimulando cambios en las secreciones gastrointestinales y en la motilidad, o actuando sobre las fibras aferentes del nervio vago que conectan con el hipotálamo. Sus efectos biológicos están mediados por la activación de dos tipos de receptores acoplados a proteínas G (CCK-AR y CCK-BR) localizados en las fibras aferentes vagales (Farningham *et al.*, 1993). Los mismos, participan en la inhibición de la secreción de GHRL y en la estimulación de PYY, otro péptido supresor de la ingesta.

El papel de la CCK, como un factor de saciedad se ha estudiado en varios animales, incluyendo ratas (Gibbs *et al.*, 1973; Fink *et al.*, 1998), cerdos (Gregory *et al.*, 1989), ovinos (Della-Fera & Baile, 1980), y seres humanos (Lieverse *et al.*, 1994). Si bien el estudio de la participación de CCK en la regulación del consumo en rumiantes comenzó al final de la década de 1970 e inicio de la de 1980 (Grovm, 1981), su función es poco clara. Actualmente se conoce que tanto las proteínas como la grasa promueven la secreción de CCK logrando su pico máximo a los 30 minutos luego del inicio de la ingesta (Choi *et al.*, 2000). En condiciones de restricción alimenticia, carneros castrados alimentados *ad libitum* presentaron mayor concentración plasmática de CCK comparados con aquellos que fueron alimentados con dietas restrictivas (Relling *et al.*, 2009). Suominen *et al.*, (1998) reportaron en vacas lecheras tanto la concentración sanguínea de CCK como la abundancia de su ARNm disminuyeron durante una deprivación alimenticia severa y de corta duración (ayuno durante 60 hs) retornando a los valores previos al tratamiento entre las 16 y 24 hs de realimentación. Los estudios de Relling & Reynolds (2007) y de Bradford *et al.* (2008) al trabajar con un suplemento lipídico encontraron un aumento en la concentración plasmática de CCK-8 y una reducción en el consumo de materia seca de vacas lecheras en producción. Sin embargo, en otro experimento, los lípidos fueron infundidos en el abomaso, y si bien el consumo disminuyó, los cambios en las concentraciones plasmáticas de CCK-8 no fueron evidentes (Benson & Reynolds, 2001). En un experimento posterior, pero realizado con ovinos, Relling *et al.* (2011) infundieron por vía endovenosa dosis crecientes de CCK-8 hasta alcanzar concentraciones plasmáticas similares a las observadas al dar un suplemento con grasa. A pesar de observar una disminución del consumo diario y en la primera hora después de ofrecer el alimento en los corderos alimentados con grasa, no hubo cambios en los infundidos con CCK-8, pese a que la

concentración plasmática de esta hormona fue similar. Por otro lado, Kumar *et al.* (2004) señalan que la infusión intravenosa de devazepide (MK-329), un antagonista de los receptores de CCK, aumentó la motilidad retículo-rumen pero no observó cambios en el consumo.

En resumen, se puede decir que existe suficiente información para creer que los mecanismos que operan en animales monogástricos serían igualmente relevantes para las especies rumiantes. No obstante, se requiere mayor comprensión de la naturaleza de los centros reguladores, de las señales a las que responden, y de la secuencia de eventos que llevan a concretarse en señales orexigénicas y/o anorexigénicas en estos animales.

En el presente trabajo se ha profundizado en el estudio de los péptidos NPY, AgRP, POMC y CCK-AR, como actores centrales de la regulación del consumo, y en GHRL y CCK como representantes de los factores periféricos. En la figura 1 se esquematizan estas y más señales tanto periféricas como centrales que actúan en la regulación del consumo de rumiantes.

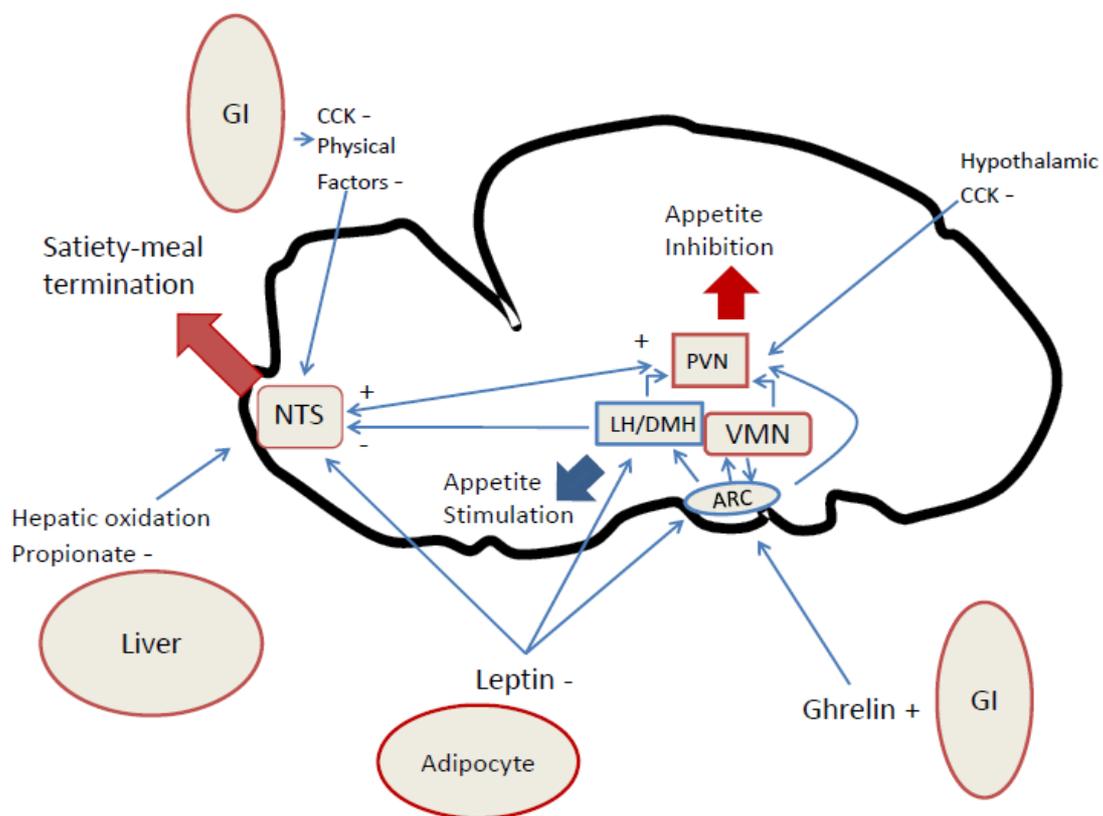


Figura 1. Esquema de regulación central y periférica del apetito en rumiantes. Tomada de Sartin *et al.* (2010).

II.5. Cambios en los Niveles de Transcritos de Factores Orexigénicos y Anorexigénicos Frente a Situaciones de Déficit Energético

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de la información científica relacionada con los efectos de subnutriciones sobre cambios en la expresión de ARNm de genes con efectos orexigénicos y/o anorexigénicos, ha sido generada en roedores (Marks *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1999) y en peces (Silverstein & Plisetskaya, 2000; Narnaware & Peter, 2001 a y b; MacDonald & Volkoff 2009), siendo muy limitada la generada en rumiantes y particularmente en bovinos.

En ovinos, Sorensen *et al.* (2002) registraron incrementos en la expresión génica de NPY y AgRP a nivel hipotalámico en hembras que se encontraban en un balance energético negativo debido a la lactancia. En el mismo sentido, Adam *et al.* (2002), hallaron que un BEN inducido por 4 días de ayuno en capones también incrementó la expresión los neuropéptidos orexígenos NPY y AgRP. Estos resultados son similares a los obtenidos por Archer *et al.*, (2002) en carneros castrados en una situación de baja condición corporal. En un tercer estudio donde se compararon ovejas “delgadas” con “gordas”, el número de neuronas positivas para NPY aumentó en un 225% (Kurose *et al.*, 2005) y Henry *et al.* (2000) encontraron que ovinos “delgados” con un 20% menos de grasa corporal que los “gordos”, mostraron mayor expresión de este neuropéptido orexigénico. Más recientemente Relling *et al.*, (2009), reportaron una disminución de la expresión hipotalámica de ARNm de genes orexigénicos (NPY/AGRP) en ovinos sometidos a una dieta *ad libitum* en comparación con los valores obtenidos en ovinos bajo dieta restringida.

La expresión génica de POMC en el ARC durante una restricción alimenticia ha sido reportada en varios estudios como reducida (McShane *et al.*, 1993) pero mayormente como incambiada (Henry *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2002; Archer *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2004; Relling *et al.*, 2009) y los bajos niveles de expresión hipotalámica de CART hallados por Adam *et al.*, (2002) no llegaron a valores significativos.

En cuanto a los resultados obtenidos sobre la acción de la GHRL en rumiantes, estos indican que esta hormona ejerce una acción orexigénica al igual que sucede en animales monogástricos. Wertz-Lutz *et al.* (2006) y Harrison *et al.* (2007) han reportado estos efectos en ovinos y bovinos respectivamente pero aún no se han reportado resultados contundentes sobre cambios en la expresión de su ARNm en el abomaso y

bajo situaciones de stress nutricional. Con relación a la expresión de CCK en rumiantes se ha descrito que la alimentación de vacas promueve la expresión de su ARNm en el duodeno (Suominen *et al.*, 1998) pero tampoco existen mayores trabajos que ahonden en la búsqueda de la expresión diferencial del transcripto de la hormona ni de sus receptores en rumiantes en un BEN.

III. HIPÓTESIS

La variación en la oferta de forraje a lo largo del año afecta los mecanismos de regulación del consumo energético que se evidencian en cambios en la expresión de genes claves (a nivel central y periférico) en el control del consumo y del balance energético.

La expresión génica de péptidos orexigénicos y anorexigénicos a nivel hipotalámico y gastrointestinal se modifica en bovinos que transcurrieron por una situación de déficit energético, consecuencia de una alimentación restringida por un período prolongado.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es cuantificar el efecto de la oferta de forraje de campo nativo (alta oferta vs baja oferta, AO vs BO) sobre los cambios en la expresión génica de los péptidos orexigénicos y anorexigénicos a nivel hipotalámico y gastrointestinal de bovinos.

IV.2. Objetivos Específicos

Este trabajo presenta como objetivos específicos:

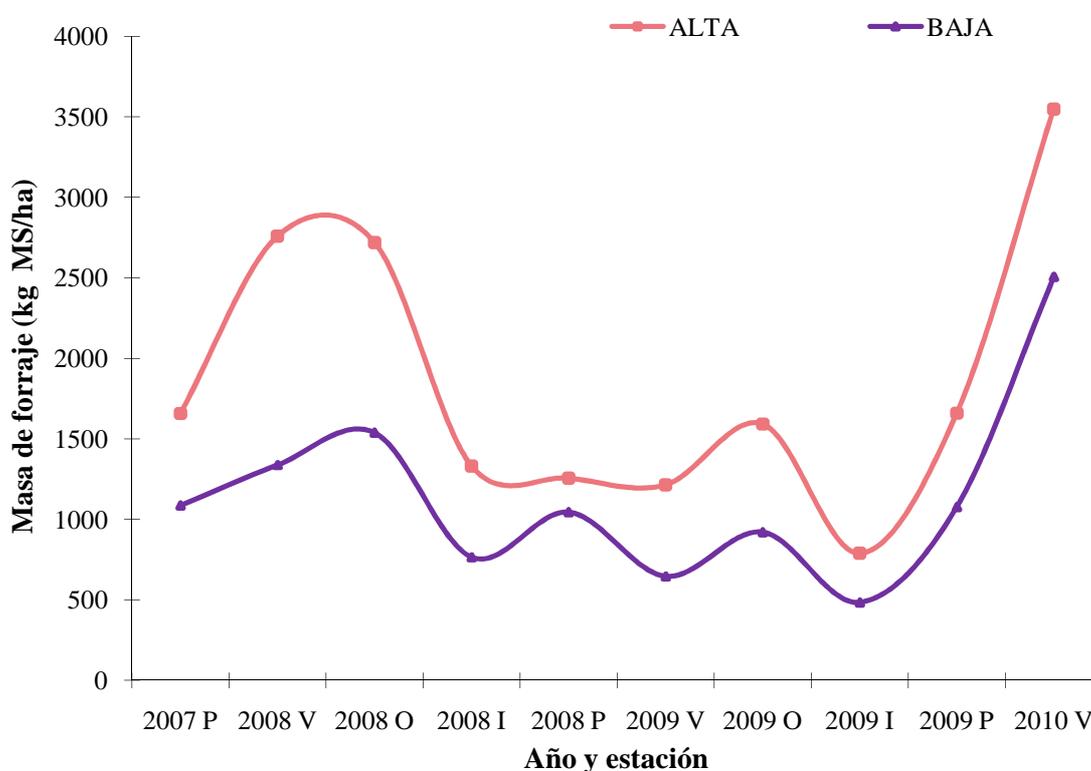
- Cuantificar la expresión de ARNm de los neuropéptidos NPY/AgRP, POMC/CART y del receptor tipo a de CCK (CCK-AR) en el hipotálamo de hembras bovinas.
- Cuantificar la expresión de ARNm de los péptidos GHR y CCK en el abomaso de hembras bovinas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

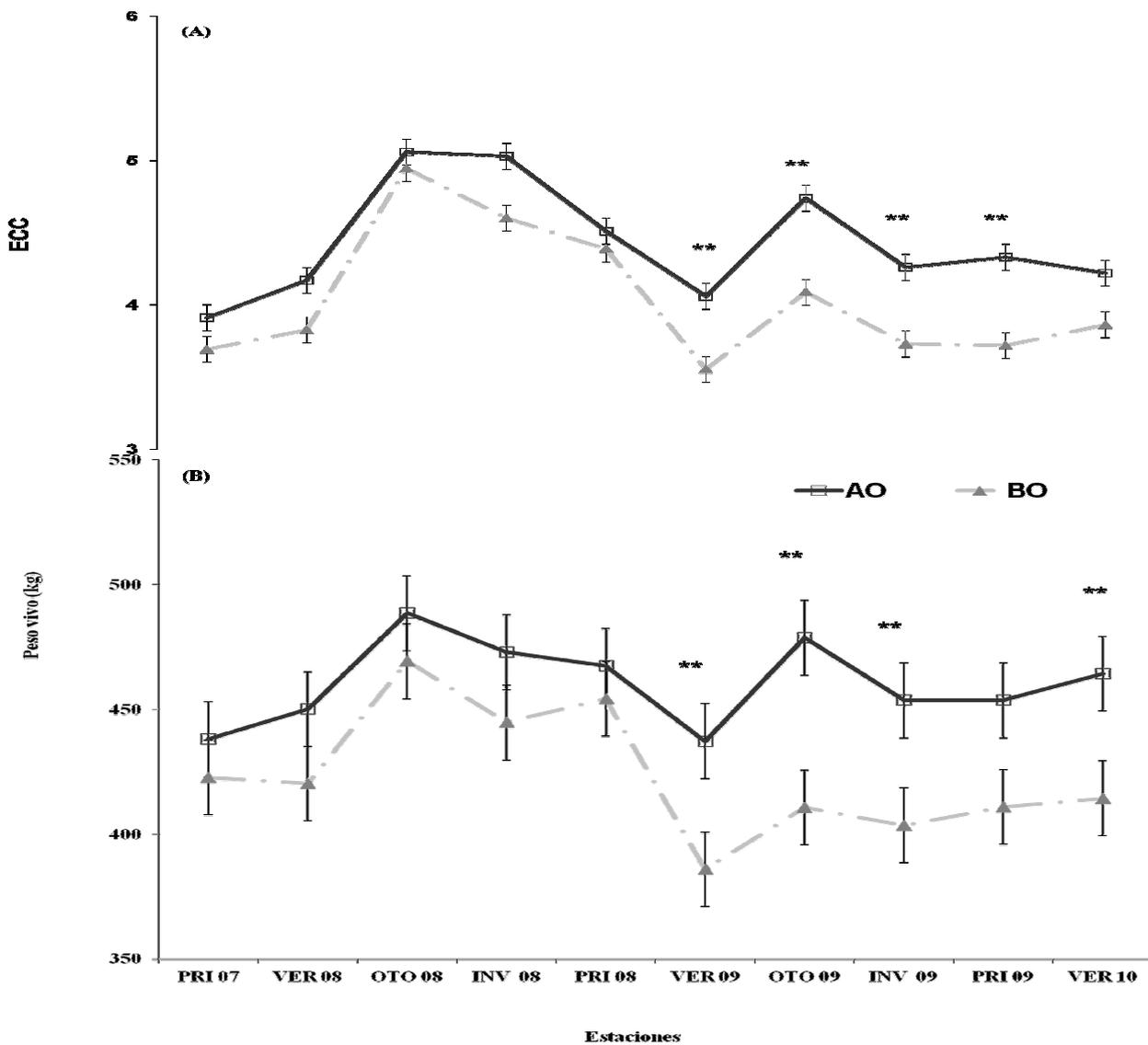
V.1. Descripción General del Experimento

Se utilizaron un total de 18 vacas de carne procedentes de 2 experimentos previos (*FPTA #242*, y *FPTA #262*). (Anexo I: tabla de animales utilizados). Los animales fueron sometidos a dos ofertas de forraje promedialmente de 2.5 y 4 kg de materia seca/kg de peso vivo (baja oferta, BO, vs alta oferta, AO respectivamente) durante tres años consecutivos (2007-2009) (Grafica 1). El objetivo fue lograr una diferencia en el balance energético entre los animales de ambos grupos. Para ello se monitoreó la condición corporal (ECC) y su peso vivo, logrando valores menores para ambos parámetros en los bovinos en BO (Grafica 2 A-B).

Al final del 3er año y a los 190 ± 15 días posparto (fin del otoño) las vacas fueron sacrificadas en instalaciones frigoríficas colectándose muestras de hipotálamo y abomaso, las cuales fueron colocadas inmediatamente en nitrógeno líquido y conservadas en freezer a -80°C para su posterior análisis.



Grafica 1. Variación de la oferta de forraje medida en kilogramo de materia seca por hectárea a lo largo de los tres años de experimentación.



Gráfica 2. A) Condición corporal de animales sometidos a BO y AO a lo largo de los 3 años de experimentación divididos en estaciones; B) Peso vivo de animales en BO y AO a lo largo de los 3 años de experimentación dividido en estaciones. ECC, escala de condición corporal según Vizcarra *et al.*, (1986); AO, alta oferta de forraje; BO, baja oferta de forraje; * $p < 0.05$ valores significativos.

V.2. Extracción de ARN

A partir de las muestras de hipotálamo y abomaso se extrajo el ARN total de cada tejido utilizando TRIZOL (*Ron's FasTri, BIORON*). (Anexo II: protocolo de extracción de ARN). Este método de extracción se basa en la solubilidad diferencial de los componentes celulares entre dos fases no miscibles. El TRIZOL está compuesto por una mezcla de fenol (donde los ácidos nucleicos son insolubles) y tiocianato de guanidino (agente desnaturizante de proteínas e inhibidor de proteasas) a un pH 4,5 que mantiene la integridad del ARN durante la extracción. La adición de cloroformo, seguida de una etapa de centrifugaciones sucesivas permite separar la fase acuosa que contiene el ARN total de la fase orgánica (ADN y proteínas). Finalmente el ARNm se recupera mediante una precipitación selectiva con cloruro de litio 2.5M. (Anexo III: protocolo de precipitación con LiCl)

V.3. Tratamiento con ADNAsas

Luego de obtenido el ARN se realizó un tratamiento con desoxirribonucleasas (DNAase I Amplification Grade; Invitrogen™), según las instrucciones del fabricante, con el fin de eliminar posibles contaminaciones de ADN ocurridas durante la extracción (Anexo IV: protocolo de tratamiento con desoxirribonucleasas).

La concentración del ARN extraído se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando un *NanoDrop* 1000 (Thermo Fisher Scientific) y se comprobó su pureza e integridad mediante: a) las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 (>1.8) y b) electroforesis en gel de agarosa al 1%.

V.4. Retrotranscripción

La retrotranscripción (RT) consiste en la generación de una cadena de ADN de doble hebra a partir de ARN de cadena simple. Es un paso crítico dentro del experimento pues contaminaciones con sales, fenol, alcohol u otros inhibidores acarreados de pasos previos, pueden alterar la eficiencia de la RT.

La reacción se realizó utilizando el kit "First Strand cDNA Synthesis" (*BioLabs Ing.*) con hexámeros no específicos y 1 µg de ARN total como molde, siguiendo las instrucciones del fabricante. (Anexo V: protocolo de retrotranscripción). Las muestras de ADNc obtenidas se almacenaron posteriormente a -80° C hasta su posterior estudio.

V.5. Amplificación

V.5. a. Diseño de cebadores.

Se diseñaron cebadores específicos para la amplificación de los genes objetivos de GHRL y de CCK en abomaso y para la amplificación de genes objetivos de NPY, AgRP, POMC, CART y CCK-AR en el hipotálamo. Para ello, se obtuvo la secuencia del ARNm de cada gen a partir de bibliotecas genómicas contenidas en *Gene Bank* (programa disponible *on line* en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Luego se procedió al diseño de primers de forma manual utilizando como herramienta el programa Primer 3 (*Primer3*, Input version 0.4.0). Se tomó como criterio general que el porcentaje de CG (%CG) fuese en lo posible 50%, que la temperatura de melteo (TM) de los pares de primers fuese similar entre sí, que el largo de los mismos oscilase entre 20 y 24 pb y que el tamaño del amplicón generado fuese entre 80 y 120 pb.

Una vez obtenidos los 6 juegos de cebadores se procedió a analizarlos de dos maneras: 1) a través de la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para comprobar la especificidad de los oligonucleótidos por las regiones en cuestión y 2) por medio del programa *on line* IDT (*Integrated DNA Technologies*) utilizando la herramienta *OligoAnalyzer*. Finalmente, fueron encargados para su fabricación al laboratorio *SBS Genetech Co*, Beijing, China (Tabla 2).

Tabla 2. Cebadores utilizados para la cuantificación de genes problema. CCK; colecistoquinina, GHRL; ghrelina, CCKAR; receptor de colecistoquinina tipo A, NPY; AgRP; péptido similar al agouti, POMC; pro-opio-melanocortina.

* Secuencias del Gene Bank

Gen	Nº de accesión *	Sentido	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto (pb.)	% GC / Tm (°C)
NPY	NM_001014845	Foward	ATCACCAGGCAGAGATACGG	80	55 / 60.10
		Reverse	TTTCATTTCCCATCACCACA		40 / 59.75
AgRP	NM_173983	Foward	ACCGTCGCTGAAGAGGATAA	80	50 / 59.84
		Reverse	AGGATTCATGCAGCCTTACG		50 / 60.24
POMC	NM_174151	Foward	ACTCGGGGCCCTATAAGATG	96	55 / 60.30
		Reverse	TTGATGATGGCGTTTTTGAA		35 / 60.05
CCKAR	NM_001101865	Foward	TTGTTTCCCTTCCTCCCTCT	102	50 / 60.04
		Reverse	CCCCACAAACAGGAAAAAGA		45 / 59.94
CCK	NM_001046603	Foward	TACATGGGCTGGATGGATTT	110	45 / 60.16
		Reverse	CCTTTGAGTCAGGAGGTTGC		55 / 59.84
GHRL	NM_174067	Foward	CAGAGGACGAGCTGGAAAATC	121	55 / 59.95
		Reverse	TCCCAAAGGATGTCCTGAAG		50 / 60.04

V.5. b. PCR en tiempo real.

La abundancia de ARNm se midió por medio de PCR en tiempo real utilizando SYBR Green® (KAPA Sybr Fast Mastermix Universal) y la misma se cuantificó en forma relativa. Para ello se seleccionaron genes *house-keeping* por su expresión casi constante en los tejidos. Para este estudio los genes proteína ribosomal 9 (RPS9) y beta-actina (β -actina) fueron los utilizados como controles internos.

Como control negativo (*no template control*), se agregó a cada ensayo un tubo conteniendo todos los reactivos excepto la muestra problema. Las amplificaciones se llevaron a cabo por duplicado en una reacción de volumen final de 15 μ l, conteniendo 3 μ l cDNA, 0,9 μ l de primer mix a una concentración de 10 μ M, 7,5 μ l de SYBR Green® y 6,3 μ l de H₂O MiliQ para completar los 15 μ l finales. Las reacciones de amplificación por PCR en tiempo real fueron llevadas a cabo en un termociclador lineGeneK (Bioer, China) bajo las siguientes condiciones dadas para todos los juegos de cebadores: programa de desnaturalización (95°C por 3 minutos), programa de amplificación (40 ciclos de 95°C por 3 segundos; 60°C por 40 segundos) y programa de cuantificación (72°C por 20 segundos). Un último ciclo de melteo (60°C a 95°C durante 20 segundos).

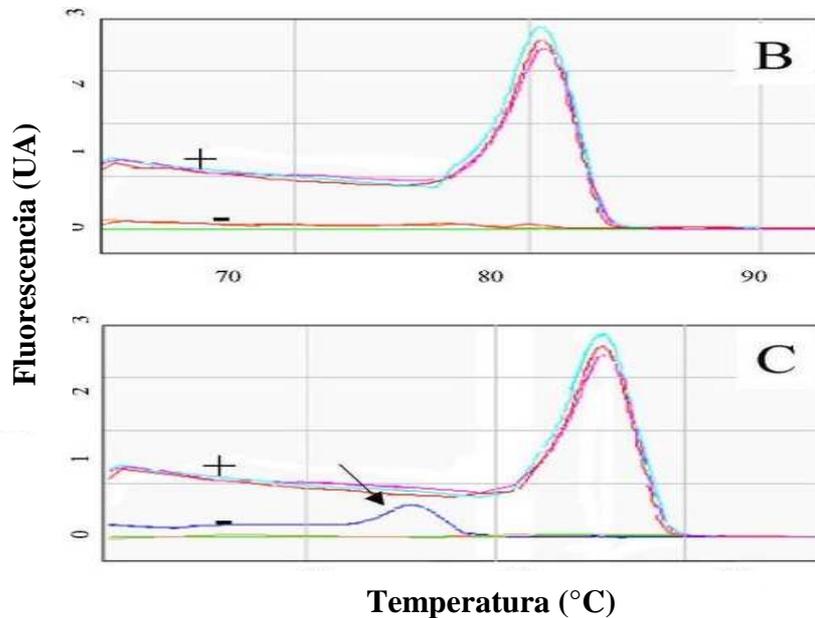
con un ritmo de calentamiento de 0,5°C por segundo) fue realizado para testear la especificidad de las amplificaciones.

La técnica de PCR en tiempo real, RT-PCR (del inglés *real time polymerase chain reaction*), está basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pero presenta la particularidad de amplificar y al mismo tiempo cuantificar moléculas específicas de ADN o ADN copia (ADNc). Para ello, se agrega a la mezcla de reacción un fluoróforo capaz de unirse a la secuencia del ácido nucleico problema. Este marcador emite una señal fluorescente proporcional a la cantidad de ADN formado la cual es detectada y procesada en tiempo real.

Las técnicas de RT-PCR pueden ser clasificadas según el empleo de fluorocromos no específicos o bien sondas moleculares dependientes de la secuencia. En las técnicas basadas en fluorocromos inespecíficos varios han sido descritos pero uno de los más empleados en la actualidad es el SYBR Green. Esta molécula, posee la ventaja de requerir sólo un par de cebadores para efectuar la amplificación (lo que abarata su costo) y es ampliamente distribuido por los diferentes laboratorios.

Sin embargo, debido a que el SYBR Green se une de manera indistinta a productos de ADN de doble cadena puede llegar a emitir una señal luminosa por aquellos fragmentos generados inespecíficamente (dímeros de primer) durante la RT-PCR. Esta limitación puede dar lugar a resultados erróneos y para evitarlos se debe: a) emplear condiciones de reacción óptimas, b) realizar una selección cuidadosa de los cebadores y c) efectuar un análisis de la curva de melteo o disociación del producto logrado. Este análisis permite que los productos no específicos puedan ser discriminados de los amplicones deseados mediante su temperatura de fusión o T_m (Ririe, *et al.*, 1997). Durante el ciclo de melteo (ver más adelante) los ácidos nucleicos de doble cadena se separan por efectos de la temperatura provocando que el colorante se disocie lentamente conduciendo a una disminución en la fluorescencia. La derivada de la medida de esta señal luminosa en función de la temperatura, da como resultado una curva cuyo pico máximo representa la temperatura de fusión del producto. La T_m es característica de cada secuencia nucleotídica y representa la temperatura a la cual el 50% del ADN o ADNc se encuentra disociado. Por lo tanto, varios productos de amplificación se verán representados por igual número de picos con diferentes T_m . Para discriminar entre aquel específico es necesario saber que este se disocia a una temperatura más alta que los artefactos como dímeros de primers (Figura 2).

Figura 2. Curvas de disociación de varios productos de RT-PCR representados en distintos colores. Se observan reacciones con amplificación de un producto específico (rosado, celeste) y otras con resultado negativo (verde, naranja). En C, se señala con una flecha el pico de disociación dado para los dímeros de los cebadores, diferente al esperado para el producto de amplificación en cuestión.



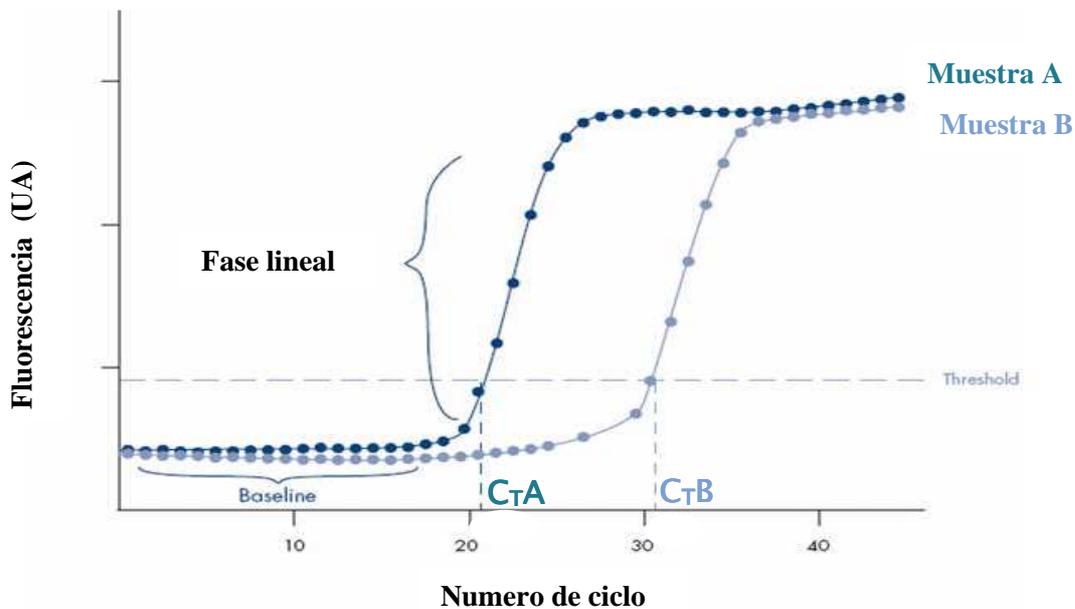
V.6. Cuantificación de ARNm

El resultado de una PCR a tiempo real es visualizado en un gráfico de amplificación. En él se expresa la fluorescencia leída por el termociclador en el eje de las ordenadas y el número de ciclos de la PCR en el eje de las abscisas. De esta forma, la curva de amplificación consta de una fase inicial donde la producción de fluorescencia (ADNc producto) está por debajo del nivel de detección del equipo, una en la que se da un incremento de la fluorescencia, el cual es exponencial en su inicio, y una tercera fase (*plateau*) donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia (Figura 3). En este gráfico es posible establecer un valor de fluorescencia umbral que representa la zona a partir de la cual se produce un aumento significativo de la fluorescencia. Este valor se representa en el gráfico con una recta horizontal (línea *Threshold* o Umbral).

El ciclo umbral o C_T (por su nombre en inglés *threshold cycle*) determinado por el punto de corte entre la línea umbral y la curva de amplificación, es el ciclo de amplificación a partir del cual la fluorescencia comienza a aumentar de manera

apreciable por encima de la fluorescencia de fondo (Pfaffl, 2001). En otras palabras, el valor C_T está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia, dada por la acumulación de producto, comienza a ser detectable. Para determinar el valor C_T de cada muestra se utilizó el método de *Fit Point (Fit Point Method)*.

Figura 3. Grafica de amplificación por PCR en tiempo real. La línea base o Baseline hace referencia a los ciclos iniciales en los que no hay cambios detectables en la cantidad de fluorescencia emitida.



Una vez obtenido el valor C_T de cada muestra se procede a la cuantificación del producto. Existen dos estrategias para la cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real: 1) cuantificación absoluta y 2) cuantificación relativa. La cuantificación absoluta es importante en los casos donde se desea determinar el número exacto de transcritos presentes en la muestra mientras que la cuantificación relativa es una técnica óptima para la cuantificación en la mayoría de estudios fisiológicos y/o patológicos (Joshua *et al.*, 2006).

En una cuantificación absoluta la señal de fluorescencia se relaciona a un número inicial de copias de ADN por medio de una curva de calibración de concentraciones conocidas de por ejemplo, plásmidos recombinantes, ADN genómico, oligonucleótidos sintéticos, etc. La fiabilidad de este tipo de protocolo de cuantificación depende en que las eficiencias de amplificación para la curva de calibración como para

los genes problema sean idénticas (Pfaffl, 2004). A su vez, la generación de material estándar estable y fiable es muy laboriosa y debe ser cuantificado con precisión.

En el método de cuantificación absoluta, la relación entre los valores C_T de la muestra y los valores C_T del control se calculan asumiendo una eficiencia de amplificación del 100%. No obstante un gran número de variables (largo de amplicón, estructura secundaria, diseño de primers, efectividad a la hora de realizar la RT, entre otras) pueden afectar la eficiencia de la PCR, provocando que el resultado de expresión génica se encuentre sobre o subestimado por parte del investigador. Como una alternativa a esta limitación surge un método de cuantificación relativa que brinda resultados más confiables. Es una técnica algo más sencilla que la cuantificación absoluta pues no requiere estándares de concentraciones conocidas. La metodología está basada en la cuantificación del nivel de expresión del gen problema a través de múltiples muestras, en función de los niveles de expresión de ARNm de varios (al menos 2) genes de referencia o housekeeping (Pfaffl, 2004). Se han publicado dos modelos (Pfaffl 2001; 2004) para la cuantificación relativa de ARNm; 1) método sin corrección por eficiencia y 2) método por corrección de eficiencia. Este último fue el empleado en este trabajo y sigue la ecuación a continuación donde R es la relación de expresión entre los genes;

$$R = \frac{(E_{\text{gen problema}})^{\Delta C_{t_{\text{gen problema}}}}}{(E_{\text{gen referencia}})^{\Delta C_{t_{\text{gen referencia}}}}} \quad (\text{Ec.1})$$

V.7. Cálculo de Eficiencia

Como se estableció en los párrafos anteriores se debe conocer las distintas eficiencias de amplificación para lograr la cuantificación de los genes problema. Para ellos, se realizaron 5 diluciones seriadas a partir de un pool de ADNc 33,33ng/μL que luego fueron amplificadas por PCR en tiempo real siguiendo el protocolo establecido para este trabajo. Seguidamente se graficaron los valores de C_T en función del logaritmo de la concentración de ADNc, obteniendo una curva de calibración para cada gen (ver resultados). La eficiencia se calculó a partir de la pendiente de la recta según la siguiente ecuación:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1 \quad (\text{Ec.2})$$

V.8. Análisis Estadístico

Se elaboró una base de datos para cada animal en estudio integrando la información recabada durante los proyectos *FPTA #242* y *FPTA #2* (peso devastado al momento de la faena, fecha de parto y grupo genético) con los datos de expresión génica obtenidos en este trabajo.

Los datos fueron analizados en un diseño completamente aleatorizado utilizando el programa SAS 2009. Se realizaron análisis univariados de la expresión génica para identificar “outliers” e inconsistencias y para verificar la normalidad de los residuales.

La expresión génica fue analizada mediante el procedimiento mixto del SAS (PROC MIXED). El modelo incluyó la oferta de forraje (OF), el peso devastado (PD) y la fecha de parto (FP) como efectos fijos y el grupo genético como efecto aleatorio tal como se muestra a continuación:

$$Y = \mu + \beta_1 OF + \beta_2 PD + \beta_3 FP + \varepsilon \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde Y es la concentración relativa de ARNm de cada gen; μ es la a media general, β_1 el efecto de la oferta de forraje (AO vs BO); β_2 el efecto del peso devastado; β_3 el efecto de la fecha de parto y ε el error experimental.

Los resultados fueron expresados como “least means squares” con su error estándar (LMS \pm SE). El valor de significancia fue establecido en $P < 0.05$ mientras que valores entre 0.1 y 0.5 fueron considerados como tendencia.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1. Extracción del ARNm

Las extracciones de ARN funcionaron correctamente, y se obtuvo una concentración adecuada de ARN bovino en las muestras seleccionadas para cada tejido. En las tablas 3 y 4 se exponen las concentraciones de ARN en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ luego del tratamiento con ADNasa y las medidas de pureza (relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230) respectivas para cada muestra de cada tejido.

Las muestras utilizadas para este trabajo se encontraban congeladas a -80°C desde el año 2009. El congelar los tejidos permite posponer el aislamiento de ARN pero puede significar un trabajo más laborioso e incluso puede llegar a sacrificar la integridad de los tejidos. Debido a la gran sensibilidad de la PCR en tiempo real, la calidad del material de partida es uno de los puntos más importantes a la hora de emplear la técnica. Por ello, la extracción de los ácidos nucleicos toma un papel crítico y fundamental. En el cerebro la cantidad de ARN total es aproximadamente de 2 a 0.05 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido (Applied Biosystems Guide, 2008), lo cual da una idea estimada de cuanto ARN total puede ser recuperado a partir del procedimiento de extracción. Si bien se contaba con tejidos congelados desde hacía dos años las extracciones fueron realizadas con éxito y las cantidades extraídas fueron adecuadas y suficientes para continuar con los trabajos experimentales en ambos tejidos.

Tabla 3 y 4. Descripción de la concentración y pureza obtenida para cada muestra en hipotálamo y abomaso.

3) Hipotálamo				4) Abomaso			
Muestra	Concentración (µg/µL)	260/280	260/230	Muestra	Concentración (µg/µL)	260/280	260/230
2	0,4393	2,09	1,95	2	0,505	2,03	1,51
4	1,0331	2,09	1,86	4	0,827	2,11	2,04
5	0,8595	2,09	2,11	6	0,776	2,12	1,97
6	0,5736	2,09	1,99	8	0,777	2,06	1,42
7	0,4407	2,1	2,07	10	0,298	1,81	0,96
8	0,4657	2,08	1,66	11	0,581	2,36	4,28
9	0,7399	2,05	1,87	14	0,86	2,1	1,62
10	0,59	2,14	1,89	16	0,778	2,12	2,04
11	0,3706	2,11	1,86	18	0,82	2,12	2,08
12	0,3489	2,11	2,05	21	0,952	2,12	2,07
16	0,3182	2,11	1,72	22	0,949	2,14	2,11
18	0,6398	2,1	1,9	23	0,751	2,11	2,08
19	0,8345	2,1	1,99	24	0,951	2,12	2,06
21	0,4455	2,09	1,93	26	0,241	1,89	1,4
26	0,3913	2,09	1,96				
27	0,4088	2,09	1,82				

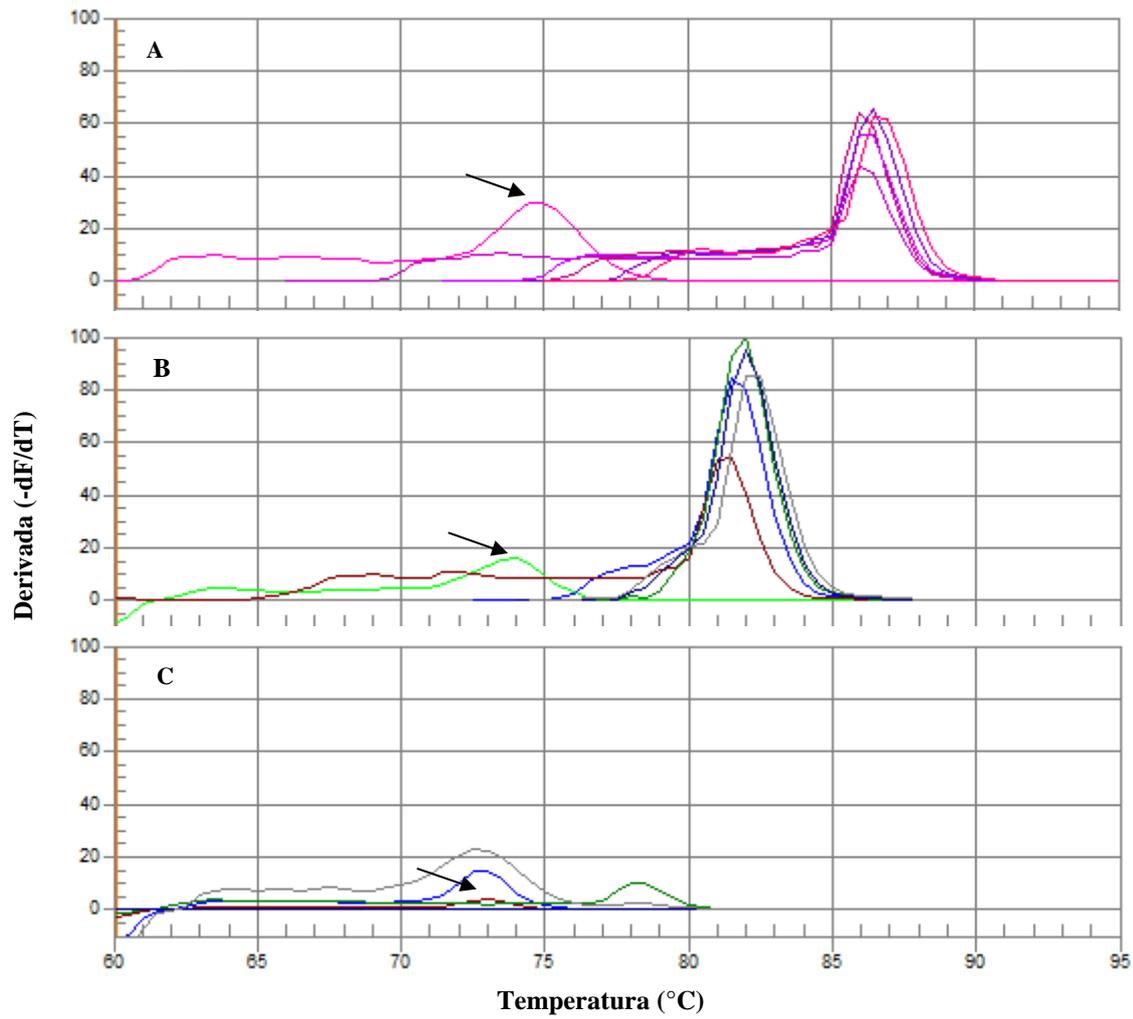
VI.2. Especificidad de los Cebadores Empleados y Producto Amplificado

El método de análisis de la curva de melteo resultó en un adecuado discernimiento (representados por las Tm únicas y específicas) de ambos genes estudiados en abomaso (CCK y GHRL) y para 4 de los 5 transcriptos estudiados en el tejido hipotalámico (AgRP, NPY, POMC, CCK-AR y CCK-BR). El estudio del transcripto de CART y CCKBR fueron descartados del ensayo debido a que no se obtuvo un único pico representante del producto de amplificación (Gráfica 3).

La curva de melteo o de disociación es una manera de ratificar la eficiencia de los primers seleccionados y así también la especificidad del producto. El resultado es un gráfico que contiene tantos picos como fragmentos distintos de ADN se han amplificado en la reacción. Si la elección de cebadores fue correcta, el tamaño del producto de PCR para el gen problema debe ser mayor que cualquier otro, por lo que su pico se producirá a una temperatura superior. En la gráfica 3, se presentan las curvas de melteo para algunos de los genes problema. Las curvas para NPY y AgRP son ejemplos de aquellos genes que presentaron un único pico de amplificación mientras que la

gráfica 3C muestra los resultados obtenidos para el gen CART. En este último se puede observar que no hubo amplificación.

Gráfica 3. Curvas de melteo; A) AgRP, B) NPY y C) CART. La flecha indica el NTC.

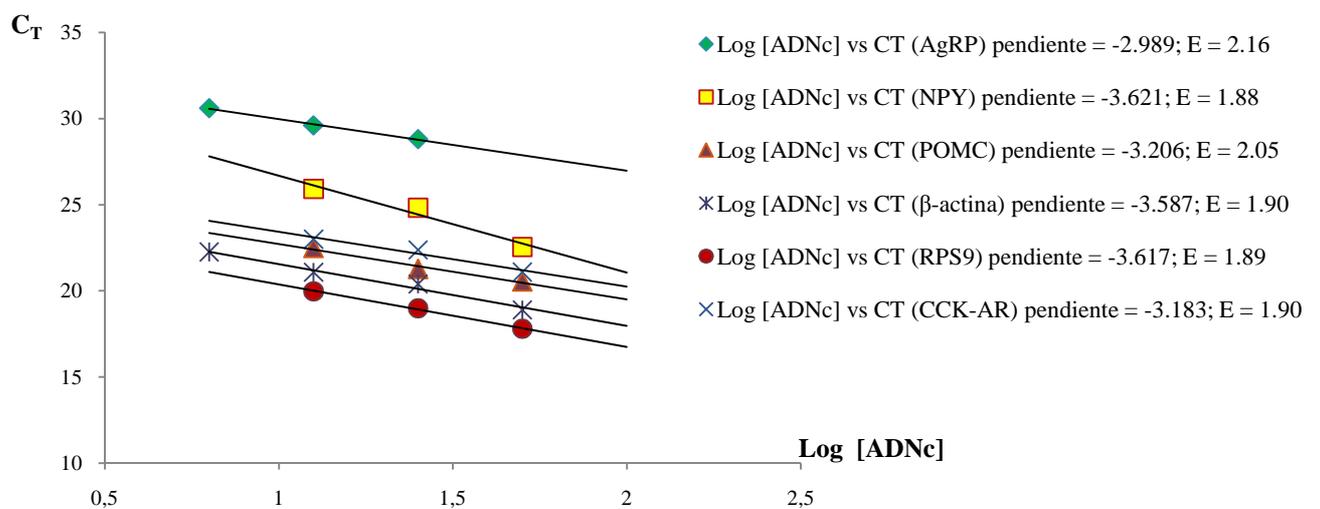


VI.3. Eficiencias de Amplificación

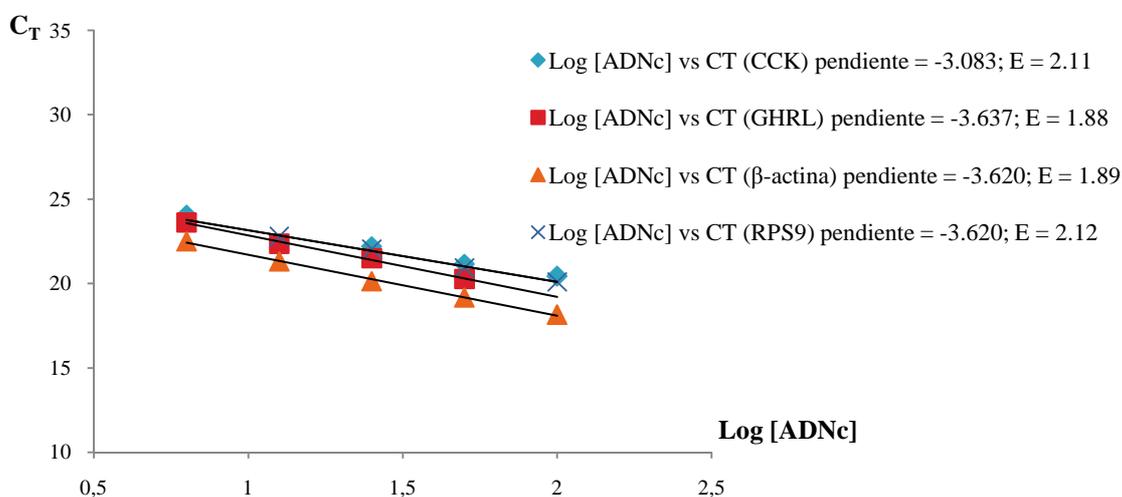
Las graficas 4 y 5 muestran las eficiencias de amplificación obtenidas para los genes problema de hipotálamo y abomaso. Si bien no se consiguieron eficiencias del 100% pues los valores fueron en gran proporción mayores a -3.3 los mismos cayeron en el rango de eficiencias aceptables para ensayos por RT-PCR ($-2,92 \geq E \leq -3,92 \rightarrow E = 100 \pm 20\%$) (James *et al.*, 2006).

La eficiencia de amplificación es la tasa a la cual el producto de PCR es generado y comúnmente es expresada como un porcentaje. Si la cantidad de amplicón es duplicada durante la fase exponencial de la reacción entonces la eficiencia es del 100%. La pendiente de la curva de amplificación (producto de graficar el valor C_T en función del logaritmo de la concentración de ADNc) es utilizada para estimar la eficiencia de la RT-PCR. Una pendiente de -3.32 indica una eficiencia de reacción del 100%, valores más negativos (ej. -3.6) representan reacciones menos eficientes y pendientes más positivas que -3.3 (ej. -2.8) pueden indicar baja calidad de la muestra. Variaciones en el patrón de extracción del ARN, y la calidad de los cebadores pueden haber ocasionado que la eficiencia de amplificación no fuese del 100%. (Joshua *et al.*, 2006).

Gráfica 4. Determinación de las eficiencias de amplificación por PCR en tiempo real en hipotálamo de los genes de referencia (β -actina y RPS9) y de los genes problema (AgRP, NPY, POMC, GHRL y CCK-AR). Se representan los valores de C_T en función del log [ADNc] de cada gen. Pendientes entre -3.1 y -3.6 representan eficiencias entre 90 y 100%.



Gráfica 5. Determinación de las eficiencias de amplificación por PCR en tiempo real en abomaso de los genes de referencia (β -actina y RPS9) y de los genes problema (GHRL y CCK). Se representan los valores de C_T en función del log [ADNc] de cada gen. Pendientes entre -3.1 y -3.6 representan eficiencias entre 90 y 100%.



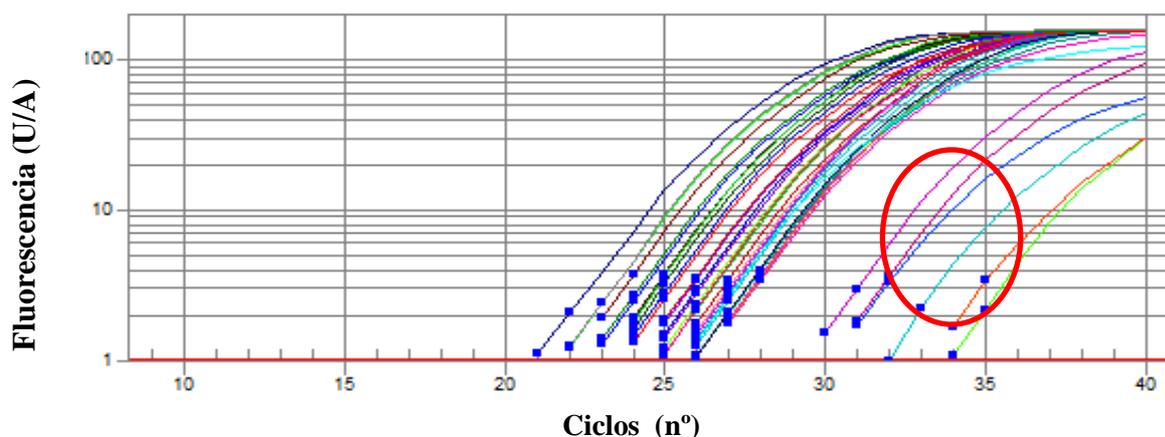
VI.4. Amplificación de ARNm

A pesar de haber logrado una correcta extracción del ARN, algunas de las muestras no presentaron eficientes gráficos de amplificación luego de haber atravesado la RT-PCR. Sus respectivos valores de C_T surgieron a partir de los 30 ciclos de amplificación por lo cual fueron eliminadas del estudio pues como se describió anteriormente, los valores de C_T son derivados directamente de la cantidad de ADNc presente en la muestra y no del ARN. Haber considerado estos valores atípicos de C_T podría haber reflejado cantidades aparentes de ARN que no se encontraban originalmente en las muestras.

Los factores que pudieron haber causado esta diferencia radican en una mala integridad del ARNm causada por una deficiente retrotranscripción asociada a la presencia de contaminadores o inhibidores y/o derivación de un inadecuado pipeteo ya que descartamos la extracción como una causa pues esta fue exitosa.

Como consecuencia de lo anterior, el número de muestras utilizadas se vio disminuido a 13 en el caso de hipotálamo y a 10 en abomaso (Gráfica 6).

Gráfica 6. Gráfica de amplificación del transcripto de NPY. El círculo rojo indica muestras que fueron descartadas del ensayo. Entre estas se encuentran los controles negativos.



VI.5. Expresión Relativa de ARNm en Hipotálamo y Abomaso

La tabla 5 muestra la expresión de los genes problemas de hipotálamo y abomaso. En la misma se puede observar que la expresión de ARNm de los genes hipotalámicos NPY y POMC no difirió entre las diferentes ofertas de forraje. Sin embargo, la expresión del péptido orexigénico AgRP tendió ($p = 0.077$) a ser menor en vacas en AO en comparación con vacas en BO (0.842 vs. 2.33 ± 0.463). La expresión del transcripto correspondiente a la hormona CCK y a su receptor tipo A (CCK-AR) fueron numéricamente mayor ($p = 0.109$ y $p = 0.157$ respectivamente) en animales sometidos a AO de forraje. En abomaso, la expresión del transcripto de GHRL no presentó diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 5. Efectos de la oferta de forraje sobre la expresión de ARNm en hipotálamo y abomaso*

Genes	Oferta		SE	p-valor
	AO	BO		
GHRL	1,205	0,812	0,197	0,255
CCK	1,176	0,147	0,332	0,109
NPY	1,951	1,361	0,792	0,613
AgRP	0,842	2,330	0,463	0,076
POMC	1,157	1,101	0,306	0,906
CCK-AR	1,912	1,313	0,257	0,157

* GHRL, ghrelina; CCK, colecistokinina; NPY, neuropéptido Y; AgRP; péptido similar al agouti; POMC; pro-opiomelanocortina; CCK-AR, receptor de colecistoquinina tipo A; AO, alta oferta de forraje; BO, baja oferta de forraje.

Cabe destacar que este trabajo se discute bajo el supuesto de que existe una relación lineal entre la abundancia de ARN de un determinado gen y su posterior traducción a proteína. Sin embargo, existen excepciones donde las proteínas no llegan a ser el producto final de la expresión de un gen, y/o este último sufre modificaciones postraduccionales.

La mayoría de los estudios sobre expresión génica de neuropéptidos hipotalámicos tanto orexigénicos como anorexigénicos han sido realizados en roedores y bajo restricciones alimenticias agudas y de corta duración (Bi *et al.*, 2003; Li *et al.*, 1998).

En rumiantes, los reportes que han medido la expresión génica de estos neuropéptidos son escasos. Los mismos, documentan una expresión diferencial dependiendo de la naturaleza y duración de la restricción alimenticia (McShane *et al.*, 1993; Adam *et al.*, 1997; Henry *et al.*, 2000; Henry *et al.*, 2001; Adam *et al.*, 2002; Archer *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2004; Archer *et al.*, 2004; Relling *et al.*, 2009). En la mayoría de estos trabajos, referidos a la especie ovina, se han estudiado restricciones alimenticias controladas (definidas como niveles inferiores o iguales a la energía requerida para mantenimiento) y de corta y mediana duración (máximo 3 meses). En ellos se reporta un aumento en la expresión del ARNm de genes con efectos orexigénicos. Asimismo, alguno de estos autores (McShane *et al.*, 1993; Adam *et al.*, 1997 y Henry *et al.*, 2001) utilizando un modelo de restricción crónica también reportaron incrementos en la expresión génica de los péptidos orexigénicos en ovinos.

Las condiciones de restricción nutricionales impuestas durante el experimento de largo plazo por las ofertas de forraje (AO y BO) en las vacas de cría en pastoreo, se puede considerar como una restricción crónica y variable a lo largo del año. Situaciones equivalentes a esta no se han encontrado en la literatura.

Wagner *et al.* (2004) reporta un aumento en la activación de neuronas hipotalámicas sintetizadoras de AgRP en ovinos en pastoreo pero bajo una restricción alimenticia caracterizada por tres días de ayuno. Si bien los resultados en cuanto a la expresión génica de AgRP se asemejan a los recabados en este estudio, la restricción alimenticia llevada a cabo por Wagner *et al.* (2004) se aparta de las condiciones a las cuales fueron sometidos los animales de nuestro trabajo. No obstante, nuestros resultados se asimilan a los reportados por Archer *et al.*, (2002) donde estudiando varios genes (NPY, AgRP, POMC y CART) el único que manifestó un incremento en su

expresión fue el AgRP. Este incremento se dio en animales que presentaron menores niveles de insulina y leptina en sangre (provenientes de tratamientos de restricción y luego alimentación *ad libitum*). En nuestro estudio si bien no se cuenta en el momento con la información de niveles hormonales es probable que los animales de BO de forraje hayan presentado también menores niveles de leptina y de grasa subcutánea.

En algunas situaciones de restricción se ha visto que no se modifica la expresión del NPY y marcadamente se modifica la de AgRP, postulándose la existencia de un efecto compensatorio entre estos dos neuropéptidos. Si bien las funciones orexigénicas del neuropéptido Y son conocidas, la ausencia del péptido o de sus receptores en modelos de ratones “knock-out” no resulta en un cese de la alimentación (Erickson *et al.*, 1996; Pedrazzini *et al.*, 1998). Esto último podría indicar que existen varios sistemas estimulando la ingesta y que la ausencia de uno de ellos no es suficiente para bloquear este crítico comportamiento.

El AgRP es un antagonista de la acción de los productos de POMC (MSH y α -MSH) a nivel de sus receptores por lo que media la acción orexigénica suprimiendo el camino de retroalimentación de las melanocortinas (Cone, 1999). Si bien se han encontrado que los niveles de ARNm de POMC se redujeron durante la lactación y durante la administración de glucocorticoides en ratas (Beaulieu *et al.*, 1988; Smith, 1993), el grado de alteración de su expresión génica fue pequeño. McShane *et al.* (1993) sometiendo a carneros a una restricción alimenticia severa y de larga duración (casi dos meses bajo una dieta basada en un 30% de sus requerimientos energéticos) observaron una disminución del 52% en la expresión de este transcrita. En nuestro estudio, la expresión del ARNm de POMC no fue afectada por la oferta de forraje lo cual es consistente con lo reportado previamente (Henry *et al.*, 2001; Sorensen *et al.*, 2002; Adam *et al.*, 2002; Archer *et al.*, 2002; 2004; Relling *et al.*, 2009; Anukulitch *et al.*, 2010) y opuesto a lo observado por McShane *et al.*, (1993). Esto último podría explicarse si tomamos en cuenta que la restricción severa a la que fueron sometidos los carneros en el estudio de McShane *et al.* (1993), no es semejante a la restricción largo a los animales durante nuestro experimento.

Es probable que los cambios en las concentraciones de ARNm de los neuropéptidos a nivel central interactúen con varias señales periféricas, como por ejemplo, los niveles de leptina, insulina, GHRL y CCK, también procesados en el hipotálamo. No se han encontrado trabajos en ruminantes que cuantifiquen cambios en la

expresión génica de GHRL frente a restricciones alimenticias. Además, los estudios que han explorado en los efectos de la administración de la hormona en la estimulación del consumo en rumiantes han llegado a resultados confusos. Algunos autores no han observado impacto alguno en el consumo (Iqbal *et al.*, 2006) mientras que otros reportan un aumento moderado de la ingesta tanto en ovinos como bovinos (Melendez *et al.*, 2006; Wertz-Lutz *et al.*, 2006) y a su vez otros, mostraron una fuerte estimulación del consumo de ovinos en respuesta a la administración de la hormona (Grouselle *et al.*, 2008).

En ratas, Kim *et al.* (2003), hallaron que la expresión del ARNm de GHRL estomacal, así como la expresión hipotalámica de su receptor (GHRH) se vio incrementada bajo un BEN provocado por un ayuno de 48 horas. Al inicio de nuestro trabajo se hipotetizó que la expresión de GHRL se vería incrementada en los animales alimentados con una BO de forraje. Esto no se observó. Todos los animales (indistintamente del tratamiento de AO o BO) fueron trasladados al frigorífico y sometidos a una espera previa al sacrificio. Conociendo el incremento pre-prandial característico de la hormona, es probable que todos los bovinos hayan experimentado aumentos en la concentración de la misma y que este haya sido la consecuencia de similares cantidades de su respectivo ARNm entre los animales.

La acción periférica de la hormona GHRL en cuanto a respuestas en el consumo en el corto vs el largo plazo es controvertida. Está descrito que esta hormona aumenta notablemente en períodos de ayuno previos a la ingesta posiblemente por su acción central sobre el sistema orexigénico NPY/AgRP, tanto en monogástricos como en rumiantes (Hayashida *et al.*, 2001; Sugino *et al.*, 2002 a,b; Reynolds *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2010). Sin embargo, tratamientos de administración de GHRL en humanos incrementaron los niveles de adiposidad sugiriendo una acción potencial más a largo plazo (Havel, 2001).

La hormona CCK es considerada una señal periférica de saciedad a corto plazo. La regulación intestinal de su expresión génica ha sido demostrada en el cerebro e intestino de ratas bajo deprivación alimenticia (Zheng *et al.*, 1987; Greenstein *et al.*, 1990) pero los resultados sugieren que los efectos hipofágicos de la hormona varían según las características de la restricción, del sexo y de la edad de los roedores (Fink *et al.*, 1998). En este estudio, se encontró que las cantidades relativas del ARNm de CCK y de su receptor tipo A, fueron numéricamente mayores en animales sometidos a una

AO a pesar de no llegar a valores de significancia. Se ha reportado previamente, que la concentración plasmática de CCK en vacas lecheras no fluctúa drásticamente luego de una ingesta fibrosa o concentrada (Furuse *et al.* 1991; Toullec *et al.* 1992). Asimismo, una administración periférica crónica de la hormona no modifica el peso corporal en vacunos ya que para compensar la respuesta anorexigénica inducida, se produce un incremento en la frecuencia de las comidas (West *et al.*, 1984). En ratas el pasaje del alimento al duodeno causa la liberación de CCK la cual aparentemente a través de sus receptores en el estómago induce una señal vía nervio vago hacia el núcleo del tracto solitario en el hipotálamo. Opuestamente, CCK en el intestino de ovinos no parecería funcionar de igual manera a pesar de ser un importante mediador de la saciedad a nivel del CNS (Grovm, 1982; Baile & Della-Fera, 1984). A diferencia de los monogástricos, la particularidad digestiva de los rumiantes en pastoreo (flujo de digesta hacia el intestino prácticamente continuo) puede ser la causante de que se manifiesten solo pequeños cambios en la concentración plasmática de la CCK (Choi & Palmquist, 1996). En este sentido, puede que ocurran cambios pequeños en la expresión del transcripto de CCK o incluso que la expresión del mismo permanezca inalterada. El único estudio encontrado en rumiantes (Suominen *et al.*, 1998) de cambios en la expresión del gen de CCK frente a un escenario de stress alimenticio, considera una situación restrictiva severa de ayuno de 48 hs a diferencia de la restricción impuesta en nuestro tratamiento (BO). En el trabajo del Suominen *et al.*, (1998), los niveles plasmáticos de la hormona acompañaron los niveles de expresión génica. Nosotros, no contamos con datos de la concentración plasmática de CCK para integrarlos y compararlos con los valores de cantidad de ARNm.

Han sido identificados dos tipos de receptores de CCK: CCK-AR localizado mayormente en la periferia pero también presente en áreas del CNS y CCK-BR, ampliamente distribuido en el cerebro. Aunque antecedentes indican que existe una homología de casi un 50% entre las secuencias aminoacídicas de los dos receptores existe la posibilidad de que CCK-BR sea el receptor predominante en el CNS en vacas. No obstante, ha sido comprobado en ratas que las acciones biológicas son mayormente mediadas por el receptor tipo A (Fink *et al.*, 1998). En este trabajo se planificó medir la expresión de ambos receptores en hipotálamo pero no fue posible amplificar la secuencia correspondiente al receptor tipo B debido a que los cebadores no funcionaron correctamente. Sin embargo, la expresión de CCK-AR al igual que la de su ligando,

tendió a ser mayor en animales sometidos una AO de forraje. Es probable entonces que la CCK vía activación de sus receptores, pueda interactuar y contribuir al control general del consumo en rumiantes.

VII. CONCLUSIONES

En el hipotálamo, la abundancia del ARNm del neuropéptido orexigénico AgRP tendió a ser afectada por la asignación diferencial de forraje. Sin embargo, la cantidad de transcritos de los restantes genes estimuladores del consumo estudiados (NPY y GHRL) no fue afectada.

La expresión de CCK en abomaso y de su receptor CCK-AR en el tejido hipotalámico fueron numéricamente mayores en los animales sometidos a BO pero los valores no alcanzaron la significación.

Estos resultados preliminares (presentados en forma de abstract y poster internacionalmente; ANEXO VI y VII) sugieren que bovinos en pastoreo serían capaces de adaptarse a diferentes situaciones de BE modificando la expresión de los genes orexigénicos hipotalámicos. Sin embargo, los mecanismos moleculares a través de los cuales las características de la restricción modifican la expresión de los genes reguladores, no están suficientemente comprendidos. Se requiere la exploración de otros genes involucrados en la regulación del consumo que permitan explicar y comprender este fenómeno adaptativo particular en pastoreo.

El ARNm, un dato de expresión génica, no cuenta toda la historia de lo que podría estar sucediendo en una célula. Lo ideal sería sumar en la metodología de trabajo, ensayos de cuantificación proteica para poder establecer cantidad de proteína confiable y precisa para luego presentar los resultados de mejor manera.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adam, C. L., Findlay, P. A., Kyle, C. E., Young, P., & Mercer, J.G. (1997). Effect of chronic food restriction on pulsatile luteinizing hormone secretion and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in castrate male sheep. *Journal of Endocrinology*, 152, 329–337.
- Adam, C. L., Archer, Z. A., Findlay, P. A., Thomas, L., & Marie, M. (2002). Hypothalamic Gene Expression in Sheep for Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript, Pro-Opiomelanocortin, Neuropeptide Y, Agouti-Related Peptide and Leptin Receptor and Responses to Negative Energy Balance. *Neuroendocrinology*, 75, 250–256.
- Allen, J. M., Adrian, T. E., Polak, J. M., & Bloom, S. R. (1983). Neuropeptide Y (NPY) in the adrenal gland. *J. Auton. Nerv.* 9, 559-563.
- Allen, M. S. (1996). Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. *Journal of Animal Science*. 74, 3063-3075.
- Allen, M. S., Bradford, B. J., & Oba, M. (2009). BOARD-INVITED REVIEW: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants, *J. Anim. Sci*, 87, 3317–3334
- Anukulitch, C., Rao, A., Pereira, A., McEwan, J., & Clarke, I.J. (2010). Expression of Genes for Appetite-Regulating Peptides in the Hypothalamus of Genetically Selected Lean and Fat Sheep. *Neuroendocrinology*, 91, 223–238.
- Arambarri, F., Barla, F., Laporta, J., Gutierrez, V., Machado, P., Pereyra, F., Espasandin, A. C., Lopez-Mazz, C., & Carriquiry, M. (2010). Evolución de las reservas corporales en vacas de cría gestantes de distintos grupos genéticos bajo diferentes ofertas de forraje del campo natural. *Agrociencia* 3, 175.

- Arbeletche, P., & Cividanes, J.L. (2011). Análisis del agro-negocio desde la perspectiva de gestión empresarial: el caso de Uruguay. Documento accesible en: <http://xivrem.ujaen.es/wp-content/uploads/2011/11/50-R-070M104.pdf>
- Archer, Z. A., Rhind, S. M., Findlay, P. A., Kyle, C. E., & Adam, C. L. (2000). Effects of body condition and increased level of food intake on gonadotrophin (LH) secretion and hypothalamic NPY, AgRp, ObRb and POMC gene expression in castrate male sheep, *Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series*, 25, 45 Abstr.
- Archer, Z. A., Rhind, S. M., Findlay, P. A., Kyle, C. E., Thomas, L., Marie, M., & Adam, C. L. (2002). Contrasting effects of different levels of food intake and adiposity on LH secretion and hypothalamic gene expression in sheep. *J. Endocrinol*, 175, 383-393.
- Archer, Z. A., Findlay, P. A., McMillen, S. R., Rhind, S. M., & Adam, C. L. (2004). Effects of nutritional status and gonadal steroids on expression of appetite-regulatory genes in the hypothalamic arcuate nucleus of sheep, *J. Endocrinol*. 182, 409–419.
- Archer, Z. A., Rhind, S. M., Findlay, P. A., Kyle, C. E., Barber, M. C., & Adam, C. L. (2005). Hypothalamic responses to peripheral glucose infusion in food-restricted sheep are influenced by photoperiod. *J. Endocrinol*. 184, 515-525.
- Applied Biosystems, (2008) Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR.
- Beretta, E. (1994). Investigación en pasturas naturales en el Uruguay “Utilización y manejo de pastizales”, Puignau, Juan. Ed. (Diálogo, 40) Montevideo: Programa cooperativo para el desarrollo tecnológico agropecuario del cono sur. PROCISUR–IICA. 219.

- Beaulieu, S., Gagne, B., & Barden, N. (1988). Glucocorticoid regulation of proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid content of rat hypothalamus, *Mol. Endocrinol.* 2, 727–731.
- Baile, C. A., & M. A. Della-Fera. (1984). Peptidergic control of food intake in food-producing animals. *Fed. Proc.*, 43, 2898.
- Baile, C. A., & McLaughlin, C. L. (1987). Mechanisms Controlling Feed Intake in Ruminants: A Review *J Anim Sci.*, 64, 915-922.
- Benson, J. A., & Reynolds, C. K., (2001). Effects of abomasal infusion of long-chain fatty acids on splanchnic metabolism of pancreatic and gut hormones in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 84, 1488-1500.
- Bi, S., Robinson, B. M., & Moran, T. H. (2003). Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 285, 1030–1036.
- Bradford, B. J., Harvatine, K.J., & Allen, M.S. (2008). Dietary unsaturated fatty acids increase plasma glucagon-like peptide-1 and cholecystokinin and may decrease premeal ghrelin in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 91, 1443–1450.
- Brady, L. S., Smith, M. A., Gold, P. W., & Herkenham, M. (1990). Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology*, 52, 441–447.
- Carriquiry, M., Espasandín, A. C., Astessiano, A. L., Claramount, M., Gutierrez, V., Laporta, J., & Soca, P. (2010). Visceral tissue mass of beef cows grazing different forage allowances of native pastures. Proceedings XXVI World Buiatrics Congress. 77p.

- Carriquiry, M., Grignola, P., Bialade, F., Soca, P., Espasandín, A.C., Vinales, C., & Meikle, A. (2011). Uterine gene expression in beef cows grazing different forage allowances of native pasture. *Journal of Animal Science*. 89, 599 -600.
- Chen, P., Li, C., Haskell-Luevano, C., Cone, R. D., & Smith, M. S. (1999). Altered gene expression of agouti-related protein and its colocalization with neuropeptide Y in the arcuate nucleus of the hypothalamus during lactation. *Endocrinology*, 140, 2645–2649.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Bonnet, M., Rouel, J., & Bocquier, F. (2000). Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* 59, 127–134.
- Choi, B. R., & Palmquist, D. L. (1996). High fat diets increase plasma cholecystokinin and pancreatic polypeptide, and decrease plasma insulin and feed intake in lactating cows, *J.Nutr.*, 126, 2913-2919.
- Choi, B. R., Palmquist, D.L., & Allen, M. S. (2000). Cholecystokinin mediates depression of feed intake in dairy cattle fed high fat diets. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 19, 159–175
- Cone, R. D. (1999). The Central Melanocortin System and Energy Homeostasis, *Trends in endocrinology and metabolism*, 10, 211-216.
- Cone, R. D. (2005). Anatomy and regulation of central melanocortin system. *Nat. Neurosci.*, 8, 571-578.
- Della-Fera, M. A., & Baile, C. A. (1980). Cholecystokinin-octapeptide injection in CSF decreases meal size and daily food intake in sheep. *Peptides*, 1, 51-54.
- Ebling, F. J. P., & Barret, P. (2008). The regulation of seasonal changes in food intake and body weight. *Journal of Neuroendocrinology*, 20, 827-833.

- Erickson, J. C., Clegg, K. E., & Palmiter, R. D. (1996). Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature*, 381, 415–421.
- Everitt, B. J., & Hokfelt, T. (1989). The coexistence of neuropeptide Y with other peptides and amines in the central nervous system. En: Neuropeptide Y. Mutt, V., Fuke, K., Hokfelt, T., Lundberg, J. Eds. Raven Press, Nueva York, 61-72.
- Farningham, D. A., Mercer, J. G., & Lawrence, C. B. (1993). Satiety signals in sheep: involvement of CCK, propionate, and vagal CCK binding sites. *Physiol. Behav.*, 54, 437–442.
- Fink, H., Rex, A., Voits, M., & Voigt, J-P. (1998). Major biological actions of CCK – a critical evaluation of research findings. *Experimental Brain Research*, 123, 77-83.
- Fong, T. M., Mao, C., MacNeil, T., Kalayani, R., Smith, T., Weinberg, D., Tota, M.R., & Van der Ploeg, L. H. (1997). ART (protein product of agouti-related transcript) as an antagonist of MC-3 and MC-4 receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 629-631.
- Forbes, J. M., & Provenza, F. D. (2000). Integration of learning and metabolic signals into a theory of dietary choice and food intake. En: Cronje, PB. Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction. CABI Publishing. Wallingford, U.K. pp: 3-19.
- Furuse, M., Yang, S.I., Choi, Y.H., Kawamura, N., Takahaschi, A. & Okomura, J. (1991). A note on plasma cholecystokinin concentration in dairy cows. *Anim. Prod.*, 53, 123-125.
- Galli, J. R., Cangiano, C.A., & Fernández, H.H. (1996). Comportamiento ingestivo y consumo de bovinos en pastoreo. *Rev. Agr Prod. Anim.*, 16, 119-142.
- Gibbs, J., Young, R. C., & Smith, G. P. (1973). Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol.*, 84, 488-495.

- Gregory, P. C., McFadyen, M., & Rayner, D. V. (1989). Duodenal infusion of fat, cholecystokinin secretion and satiety in the pig. *Physiol. Behav.*, 45, 1021-1024.
- Greenstein, R. J., Isola, L., & Gordon, J. (1990). Differential cholecystokinin gene expression in brain and gut of the fasted rat. *Am. J. Med. Sci.*, 299, 32–37
- Grouselle, D., Chaillou, E., Caraty, A., Bluet-Pajot, M.T., Zizzari, P., Tillet, Y., & Epelbaum J. (2008). Pulsatile cerebrospinal fluid and plasma ghrelin in relation to growth hormone secretion and food intake in the sheep. *J. Neuroendocrinol.*, 20, 1138-1146.
- Grovum, W. L. (1981). Factors affecting the voluntary intake of food by sheep. The effects of intravenous infusions of gastrin, cholecystokinin and secretin on motility of the reticulo-rumen and intake. *Br. J. Nutr.*, 45, 183–201.
- Grovum, W. L. (1982). Cholecystokinin administered intravenously did not act directly on the central nervous system or the liver to suppress food intake by sheep. *Proc. Physiol. Soc.*, 326, 55.
- Havel, P. J. (2001). Peripheral Signals Conveying Metabolic Information to the Brain: Short-Term and Long-Term Regulation of Food Intake and Energy Homeostasis. *Experimental Biology and Medicine*, 226, 963-977.
- Harrison, J. L., Miller, D.W., Findlay, P.A., Adam, C.L. (2007). Photoperiod influences the central effects of ghrelin on food intake, GH and LH secretion in sheep. *Neuroendocrinology*, 87, 182–192.
- Hayashida, T., Murakami, K., Mogi, K., Nishihara, M., Hakazato, M., Mondal, M.S., Horii, Y., Kojima, M., Kangawa, K., & Murakami, N. (2001). Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 1, 17-24.

- Henry, B. A., Tilbrook, A.J., Dunshea, F. R., Rao, A., Blache, D., Martin, G. B., & Clarke, I. J. (2000). Long-Term Alterations in Adiposity Affect the Expression of Melanin-Concentrating Hormone and Enkephalin but not Proopiomelanocortin in the Hypothalamus of Ovariectomized Ewes. *Endocrinology*, 141, 1506-1514.
- Henry, B. A., Rao, A., Ikenasio, B. A., Mountjoy, K. G., Tilbrook, A. J., & Clarke, I. J. (2001). Differential expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcript and agouti related-protein in chronically food-restricted sheep. *Brain Research*, 918, 40-50.
- Illius, A. W., Jessop, N. S. (1996). Metabolic constraints on voluntary intake in ruminants. *Journal of Animal Science*, 74, 3052 -3062.
- Iqbal, J., Kurose, j., Canny, B., & Clarke, I.J. (2006). Effects of Central Infusion of Ghrelin on Food Intake and Plasma Levels of Growth Hormone, Luteinizing Hormone, Prolactin, and Cortisol Secretion in Shee. *Endocrinology*, 147, 510–519
- Itoh, F., Komatsu, T., Kushibiki, S., & Hodate, K. (2006). Effects of ghrelin injection on plasma concentrations of glucose, pancreatic hormones and cortisol in Holstein dairy cattle. *Comp. Biochem. Physiol. A.*, 143, 97-102.
- James, J. Y., Heisler, L. E., Hwang, I. I. L., Wilkins, O., Lau, S. K., Hyrcza, M., Jayabalasingham, Bamini, Jin, J., McLaurino, J., Tsao, M.S., & Der, S. D. (2006). Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic. Acids Res.*, 34, 12, 85.
- Joshua, S. Y., Reed, A., Chen, F., & Steart, C. N. J. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, 7, 85.
- Ketelaars, J. J. M. H., & Tolkamp, B. J. (1996). Oxygen efficiency and the control of energy flow in animals and humans. *Journal of Animal Science*, 74, 3036 - 3051.

- Kim, M. S., Yoon, C. Y., Park, K. H., Shin, C. S., Park, K. S., Kim, S. Y., Cho, B. Y., & Lee, H. K. (2003). Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *Neuroreport.*, 14, 1317-20.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., & Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 9, 656-60.
- Kumar, D., Foetschel, M. A., Pringle, T. D., & Keisler, D.H. (2004). Cholecystokinin mediates intake regulation of high fat diets in ruminants by acting on the reticulo-omasal sphincter. *J. Dairy Sci.*, 87, 309 (abstract).
- Kurose, Y., Iqbal, J., Rao, A., Murata, Y., Hasegawa, Y., Terashima, Y., Kojima, M., Kangawa, K., & Clarke, I.J. (2005). Changes in expression of the genes for the leptin receptor and the growth hormone-releasing peptide/ghrelin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus with long-term manipulation of adiposity by dietary means. *Journal of Neuroendocrinology*, 17, 331–340.
- Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., Larsen, P.J., & Hastrup, S. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, 393, 72-76.
- Lambert, P.D., Couceyro, P.R., McGirr, K.M., Li Vechia, S.E., Smith, Y., & Kuhar, M.J. (1998). Cart peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse*, 29, 293-298.
- Laporta, J., Gutierrez, V., Machado, P., Pereyra, F., Lopez-Mazz, C., Espasandin, A., & Carriquiry, M. (2010). Metabolite concentrations during pregnancy in winter: pure and crossbred beef cows evaluated in two forage allowances of native pastures. Proceedings XXVI World Buiatrics Congress. 282p.

- Leibowitz, S.F., & Wortley, K. (2004). Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides*, 25, 473-504.
- Li, C., Chen, P., Smith, & M.S. (1998). Neuropeptide Y (NPY) neurons in the arcuate nucleus (ARH) and dorsomedial nucleus (DMH), areas activated during lactation, project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH). *Regulatory Peptides*, 75, 93–100.
- Lieverse, R.J., Jansen, J.B.M.J., Masclee, A.A.M, & Lamers, C.B.H.W. (1994). Role of cholecystokinin in regulation of satiation and satiety in humans. *Ann. NY Acad Sci.*, 713, 268-272.
- MacDonald, E. & Volkoff, H. (2009). Neuropeptide Y (NPY), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and cholecystokinin (CCK) in winter skate (*Raja ocellata*): cDNA cloning, tissue distribution and mRNA expression responses to fasting. *General and Comparative Endocrinology*, 161, 252–261.
- Marks, J.L., Li, M., Schwartz, M., Porte, D. Jr., & Baskin, D.G. (1992) Effect of fasting on regional levels of neuropeptide Y mRNA and insulin receptor in the rat hypothalamus an autoradiographic study. *Mol Cell Neurosci.*, 3, 199–205.
- McShane, T.M., Petersen, S.L., McCrone, S., & Keisler, D.H. (1993). Influence of food restriction on neuropeptide-Y, proopiomelanocortin, and luteinizing hormone-releasing hormone gene expression in sheep hypothalami. *Biology of Reproduction*, 49, 831–839.
- Melendez., P., Krueger, T., White, J., Badinga, L., Verstegen, J., Donovan, G.A., & Archbald, L.F. (2006). Effect of ghrelin in dry matter intake and energy metabolism in prepartum sheep: A preliminary study. *Theriogenology*, 66, 1961-1968.

- Mertens, D.R. (1994). Regulation of forage intake. En: Fahey, G.C., Collins, M., Mertens, D.R., Moser, L.E. Forage quality evaluation and utilization. Printed by The American Society of Agronomy, Inc. U.S.A.
- Miner, J.L., Della-Pera, M.A. Patemon, J.A., & Baile, C.A. (1989). Lateral cerebroventricular injection of neuropeptide Y stimulates feeding in sheep. *Am. J. Physiol.* 257, 2, 383-387.
- Narnaware, Y.K., & Peter, R.E. (2001a). Effects of food deprivation and refeeding on neuropeptide Y (NPY) mRNA levels in goldfish (*Carassius auratus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 129B, 633-637.
- Narnaware, Y.K., & Peter, R.E. (2001b). Neuropeptide Y stimulates food consumption through multiple receptors in goldfish. *Physiol. Behav.* 74, 185-190.
- Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Grantz, I., & Barsh, G.S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*, 278, 135-138.
- Pedrazzini, T., Seydoux, J., Kunstner, P., Aubert, J.F., Grouzmann, E., Beermann, Friedrich., & Brunner, H.R. (1998). Cardiovascular response, feeding behavior and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor. *Natural Medicine*, 4, 722-726.
- Perez-Clariget, R., Carriquiry, M., & Soca, P. (2007). Estrategia de manejo nutricional para mejorar la reproducción del ganado bovino. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 151, 114 -119.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29, 2002-2007.
- Pfaffl, M.W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In: A-Z of Quantitative PCR. S.A. Bustin, editor. International University Line. *La Jolla*. 3, 87-120.

- Reeve, J.R., Liddle, R.A., McVey, D.C., Vigna, S.R., Solomon, T.E., Keire, D.A. (2004). Identification of nonsulfated cholecystinin 58 in canine intestinal extracts and its biological properties *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 287, 326-333.
- Relling, A.E., & Reynolds, C.K. (2007). Feeding rumen-inert fats differing in their degree of saturation decreases intake and increases plasma concentrations of gut peptides in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 1506-1515.
- Relling, A.E., & Reynolds, C.K. (2008). Abomasal infusion of casein, starch and soybean oil differentially affect plasma concentrations of gut peptides and feed intake in lactating dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 35, 35-45.
- Relling, A.E., Pate, J.L., Reynolds, C.K., & Loerch, S.C. (2009). Effect of feed restriction and supplemental dietary fat on gut peptide and hypothalamic neuropeptide mRNA concentrations in growing wethers. *J. Anim. Sci.*, 88, 737-748.
- Relling, A.E., Loerch, S.C., & Reynolds, C.K. (2010). Plasma ghrelin and oxyntomodulin concentrations in lactating dairy cows receiving abomasal soybean oil, corn starch and casein infusions. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 38, 284-288.
- Relling A. E., Reynolds, C. K., & Loerch, S. C. (2011). Effect of intra-jugular infusion of glucagon-like peptide-1 and cholecystinin on dry matter intake, digestibility, and digesta rate of passage in growing wethers. *J Animal Sci.* 89, 168- 178.
- Reynolds, C. B., Elias, A.N., & Whisnant, C.S. (2010). Effects of feeding pattern on ghrelin and insulin secretion in pigs. *Domest. Anim. Endocrinol.* 39, 90-96.

- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., & Wittwer, C.T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 245,154-160.
- Roche, J.R., Blache, D., Kay, K.K., Miller, D.R., Sheahan, A.J., & Miller, D.W. (2008a). Neuroendocrine and physiological regulation of intake with particular reference to domesticated ruminant animals. *Nutrition Research Reviews*, 21, 207-234.
- Roche, J.R., Sheahan, A.J., Chagas, L.M., Blache, D., Berry, D.P., & Kay, J. K. (2008b). Long-term infusions of ghrelin and obestatin in early lactation dairy cows. *J. Dairy. Sci.*, 91, 4728- 4740.
- Sarika, A.A. (2006). Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity – A review. *Neuropeptides* 40, 375–401.
- Sartin, J.L., Whitlock, B.K., & Daniel, J.A. (2010). Neural regulation of feed intake: Modification by hormones, fasting, and disease. *J anim sci.*, 89, 1991-2003.
- Scarlato, S., Faber, A., Do Carmo, M., Soca, P. (2011a). Foraging behaviour of beef cows grazing native pasture: I. Effect of breed and herbage allowance on grazing and ruminating time. IX International Rangeland Congress. Rosario, Argentina.
- Scarlato, S., Faber, A., Do Carmo, M., Soca, P. (2011b). Foraging behaviour of beef cows grazing native pasture: II. Effect of breed and herbage allowance on spatial grazing patterns. Resumen aceptado a presentar en IX International Rangeland Congress. Rosario, Argentina.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porter, Jr.D., Seeley, R.J., & Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404, 661-671.
- Silverstein, J.T., & Plisetskaya, E.M. (2000). The effects of insulin on food intake regulation in fish. *Am. Zool.* 40, 296-308.

- Smith, M.S. (1993) Lactation alters neuropeptide- Y and proopiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat. *Endocrinology* 133, 1258–1265
- Soca, P., Claramunt, M., & Do Carmo, M. (2007). Sistemas de cría vacuna en ganadería pastoril sobre campo nativo sin subsidios: Propuesta tecnológica para estabilizar la producción de terneros con intervenciones de bajo costo y de fácil implementación. *Revista Ciencia Animal*, 3, 3-22.
- Soca, P., Carriquiry, M., Quintans, G., López Mazz, C.R., Espasandin, A.C., Trujillo, A.I., Marichal, M.J., Astessiano, A.L., & Pérez, R. (2008). Herramientas para mejorar la utilización del forraje del campo natural, el ingreso económico de la cría y atenuar los efectos de la variabilidad climática en sistemas de cría vacuna del Uruguay. Empleo del flushing y destete temporario de forma táctica para mejorar indicadores reproductivos y concentración de preñez de vacas primíparas. In: INIA (Org.). Seminario de Actualización Técnica: Cría Vacuna. Ed. 1, Montevideo, Unidad de Agronegocios y Difusión del INIA, 2008, v. 174, p. 120-134, ISBN: 9789974382510.
- Sorensen, A., Adam, C. L., Findlay, P. A., Michel, M., Louise, T., Travers, M. T., & Vernon, R. G. (2002). Leptin secretion and hypothalamic neuropeptide and receptor gene expression in sheep. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 282, 1227-1235.
- Sugino, T., Hasegawa, Y., Kikkawa, Y., Yamaura, J., Yamagishi, M., Kurose, Y., Kojima, M., Kangawa, K., & Terashima, Y. (2002a). A transient ghrelin surge occurs just before feeding in a scheduled meal-fed sheep. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295, 255-260.

- Sugino, T., Yamaura, J., Yamagishi, M., Ogura, A., Hayashi, R., Kurose, Y., Kojima M., Kangawa, K., Hasegawa, Y., & Terashima, Y. (2002b). A transient surge of ghrelin secretion before feeding is modified by different feeding regimens in sheep. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 298, 785-788.
- Suominen, A. H., Glimm, D. R., Tedesco, D., Okine, E. K., McBurney, M. I., & Kennelly, J.J. (1998). Intestinal nutrient-gene interaction: the effect of feed deprivation and refeeding on cholecystokinin and proglucagon gene expression. *J. Anim. Sci.*, 76, 3104-3113.
- Takahashi, H., Kurose, Y., Suzuki, Y., Kojima, M., Yamaguchi, T., Yoshida, Y., Azuma, Y., Sugino, T., Kojima, M., Kangawa, K., Hasegawa, Y., & Kobayashi S. (2010). Changes in blood pancreatic and ghrelin concentrations in response to feeding in sheep. *J. Anim. Sci.*, 88, 2103-2107.
- Toullec, R., Chayvialle, J. A., Guilloteau, P., & Bernard, C. (1992). Early-life patterns of plasma gut regulatory peptide levels in calves. Effects of age, weaning and feeding. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120A, 203-209.
- Viñoles, C., Soca, P., Espasandín, A.C., & Carriquiry, M. (2010). The effect of long-term nutrition and genetics on the reproductive performance of beef cows grazing native pasture. Proceedings XXVI World Buiatrics Congress, 348p
- Vizcarra, J., Ibañez, W., & Orcasberro, R. (1986). Repetibilidad y reproductibilidad de dos escalas para estimar la condición corporal de vacas Hereford. *Investigaciones Agronómicas*, 7, 45-47.
- Von Oetinger, A. (2009). Rol del estómago en la regulación del apetito: La ghrelina en condiciones fisiológicas y en patología digestiva. *Gastroenterol. Latinoam.*, 20, 40-48.
- Wagner, C.G., McMahon, C.D., Marks, D.L., Daniel, J.A., Steele, B., & Sartin, J.L. (2004). A role for agouti-related protein in appetite regulation in a species with continuous nutrient delivery. *Neuroendocrinology*, 80, 210–218.

- Wang, G., Lee, H.M., Englander, E., & Greeley, G.H. (2002). Ghrelin- not just another stomach hormone. *Regul. Pept.*, 105, 75-81.
- Wertz-Lutz, A.E., Knight, T.J., Pritchard, R.H., Daniel, J.A., Clapper, J.A., Smart, A.J., Trenkle, A., & Beitz, D.C. (2006). Circulating ghrelin concentrations fluctuate relative to nutritional status and influence feeding behavior in cattle. *J Anim. Sci.*, 84, 3285-300.
- Wertz-Lutz, A. E., Daniel, J. A., Clapper, A.A., Trenkle, A., & Beitz, D. C. (2008). Prolonged, moderate nutrient restriction in beef cattle results in persistently elevated circulating ghrelin concentrations. *J. Anim. Sci.*, 86, 564-75.
- West, D.B., Fey, D., & Woods, S.C. (1984). Colecistokinina persistently suppresses meal size but not food ontake in free-feeding ratas. *Am J Physiol.*, 246, 776-787.
- Wolak, M. L., De Joseph, M. R., Cator, A. D., Mokashi, A. S., Brownfield, M. S., & Urban, J. H. (2003). Comparative Distribution of Neuropeptide Y Y1 and Y5. Receptors in the Rat Brain by Using Immunohistochemistry. *The Journal of Comparative Neurology*, 464, 285-311.
- Zheng, B., Eng, J., & Yalow, R. S. (1987). Brain/gut peptides in fed and fasted rats. *Endocrinology*, 120, 714-717.

IX. ANEXOS

ANEXO I. Listado de Animales Utilizados en Este Estudio

Animal	Tipo de oferta y grupo genético
3164+	ACR
2037	ACR
2034*	ACR
3060*	ACR
4030	AP
3178+	AP
3258*	AP
1073	AP
1078*	BCR
2006+	BCR
1148*	BCR
2154	BCR
1160+	BCR
3227	BP
1131+	BP
3208	BP
1306+	BP
3092+	BP

* BP; baja oferta grupo genético puro; BCR, baja oferta grupo genético cruza, AP; alta oferta grupo genético puro, ACR; alta oferta grupo genético cruza. + Animal únicamente utilizado para tejido hipotalámico; * animal únicamente utilizado para abomaso.

ANEXO II. Protocolo de Extracción de ARN Total a Partir de Abomaso e Hipotálamo Bovino Utilizando TRIZOL (Ron's FasTr. Laboratorio BIORON)

- 1.** Agregar 1 mL de TRIZOL a un tubo eppendorf de 1,5 mL conteniendo aproximadamente 50 mg de tejido problema;
- 2.** Romper el tejido con homogeneizador limpiando bien el instrumento entre cada muestra;
- 3.** Vortear la muestra 15 segundos con el TRIZOL evitando que levante temperatura;
- 4.** Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos;
- 5.** Agregar 200 μ L de cloroformo bajo campana;
- 6.** Vortear a máxima velocidad por 15 segundos;
- 7.** Incubar a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos;
- 8.** Centrifugar por 15 minutos a 4G (13.000 rpm). Luego de este paso la mezcla se separa en una fase inferior roja, una interface blanca y una fase acuosa superior incolora (esta contiene el ARN);
- 9.** Transferir la fase superior acuosa a un tubo eppendorf y agregar unos 600 μ L de la mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Utilizar fenol de bajo pH para purificación de ARN;
- 10.** Vortear a máxima velocidad la mezcla por 10 segundos;
- 11.** Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos;
- 12.** Centrifugar por 15 minutos;
- 13.** Transferir la parte acuosa a otro tubo eppendorf y agregar 500 μ L de alcohol isopropílico;
- 14.** Mezclar invirtiendo el tubo gentilmente de 4 a 6 veces;
- 15.** Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos;
- 16.** Centrifugar por 15 minutos a 4°C. Luego de la centrifugación, el precipitado que contiene el ARN se encuentra en el fondo del tubo;
- 17.** Decante el sobrenadante cuidando no se caiga el pellet;
- 18.** Lavar el ARN (pellet) con 1ml de etanol 75%. (aspirar y evacuar el líquido con la micropipeta intentando romper el pellet). Vortear. Trabajar de ahora en más a 4°;
- 19.** Centrifugar por 2 a 5 minutos a 4°C;
- 20.** Extraer el sobrenadante e invertir el tubo sobre una toalla de papel (durante algunos minutos) para retirar el exceso de etanol. Dejar secar;
- 21.** Resuspender el pellet de ARN total en 50 μ L de agua tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato) y tomar una alícuota para determinar la absorbancia a 260 y 280 nm.

ANEXO III. Precipitación con Cloruro de Litio

1. Agregar 25 μL de Cloruro de Litio e incubar toda la noche a -20°C ;
2. Centrifugar por 20 minutos a 4°C . El pellet de ARN debe ser transparente o levemente blanco;
3. Decantar el sobrenadante con pipeta;
4. Lavar el ARN con 1 mL de etanol 75%. Aspirar y evacuar el líquido con la micropipeta intentando romper el pellet. Vortear por 30 segundos;
5. Centrifugar por 5 minutos a 4°C ;
6. Decantar el sobrenadante cuidando que no se caiga el pellet. Dejar secar el pellet unos 10 minutos;
7. Disolver con agua DEPC teniendo en cuenta la lectura en el espectrofotómetro del último paso de la extracción paso (21) y una eficiencia de 80%. [Volumen de agua DEPC = $(\text{Abs } 260 * 50 \mu\text{L}) * 0.8 / 500$];
8. Leer la concentración final en espectrofotómetro. Almacenar a -20°C .

ANEXO IV. Protocolo de tratamiento con desoxirribonucleasas (DNasa I, Amplification Grade). Laboratorio invitrogen™

(Tomado de <http://products.invitrogen.com>)

1) Agregar tubos de microcentrífuga de 0,5 µL libres de RNasa:

1 µg ARN *;

1µL 10X DNasaI Reaction Buffer;

1µL DNasa I, Amp Grade, 1 U/ µL;

H₂O DEPC hasta completar volumen final de 10 µL.

*Se utilizaron 10 µg de ARN para este trabajo. La cantidad de volumen a tomar de ARN se calculó a partir de los valores de concentración obtenidos por medición de absorbancia a 260nm luego de la extracción de ARN.

2) Incubar los tubos por 15 minutos a temperatura ambiente. Inactivar la DNasa I mediante la adición de 1 µL de EDTA 25 mM. Calentar por 10 minutos a 65°C. Almacenar a -20°C.

ANEXO V. Protocolo de retrotranscripción (First Strand cDNA Synthesis Kit).

Laboratorio BioLabsIng

(Tomado de <http://www.neb.com>)

1. En eppendorf de 0,2 μ L colocar:
 - 1 μ g de ARN *;
 - 2 μ L de d(T)23 VN (50 μ M);
 - H₂O libre de nucleasas, hasta completar volumen final de 8 μ L.

*La cantidad de volumen a tomar de ARN se calculó a partir de los valores de concentración obtenidos por medición de absorbancia a 260nm luego del tratamiento con DNasa I.
2. Desnaturalizar el ARN por 5 minutos a 70°C. Dar un spin y colocar rápidamente en hielo.
3. Agregar al tubo los siguientes componentes:
 - AMV Reaction Mix 10 μ L (AMV RT Buffer; dNTP 10 μ M; H₂O libre de nucleasas)
 - AMV Enzyme Mix 2 μ L
4. Incubar los 20 μ L de reacción a 42 °C por una hora. Inactivar la enzima por 5 minutos a 82 °C.
5. Diluir la reacción a 150 μ L con 130 μ L de H₂O MiliQ para posterior amplificación por PCR. Almacenar a -20 °C.

ANEXO VI. Abstract Presentado en la Reunión Anual Conjunta ADSA®-AMPA-ASAS-CSAS-WSASAS del 15 al 19 de Julio de 2012, Phoenix, Arizona.

V. Bassaiztegui,^{*1} Casal A.,^{*1} Astessiano A.L.,^{*1} Kaitazoff A.,^{*1} Veyga M.,^{*1} Carriquiry M.,^{*1} Trujillo A.I.^{*1}

^{*1} Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, UDELAR. Montevideo, Uruguay.

Hypothalamic and abomasal mRNA expression of regulatory feed intake genes in cows grazing different herbage allowances of native pastures.

In extensive rangeland cow-calf systems, annual variability of herbage allowance affect cow energy balance through changes in feed intake. There is scarce information about gene expression of key factors involved in the central and peripheral regulation of energy intake. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of two different herbage allowances of native pastures on hypothalamic (NPY, AgRP, POMC, CCK A receptor) and abomasal (ghrelin, CCK) mRNA expression. Pure and crossbred adult beef cows (n = 14) were used in a complete randomized block design and were maintained in the same herbage allowances throughout the year (2.5 vs. 4 kgDM/kgBW; LO vs. HI) since May 2007. Cows used in this study gestated and lactated one calf every year from 2007 to 2009. At the end of the third year, cows were slaughter at 190±15 days postpartum. Samples of hypothalamus and abomasum were collected to measure gene expression by SYBR-Green real time PCR using *RSP9* and *β-actin* as endogenous control genes. Data were analyzed using a mixed model and means were considered to differ when $P < 0.05$. Expression of NPY and POMC mRNA did not differ due to herbage allowances or cow genotype. However, hypothalamic expression of AgRp mRNA tended ($P = 0.077$) to be less in HI than LO cows (0.84 vs. 3.2 ± 0.78) and CCK A receptor mRNA was numerically ($P = 0.147$) greater in HI than LO cows (1.91 vs. 1.31 ± 0.26). Herbage allowance did not affect abomasal expression of CCK mRNA while ghrelin was greater ($P < 0.05$) in HI than LO cows (2.37 vs. 0.27 ± 0.52). Results suggest that rangeland beef cows are sensitive to different nutritional planes and may respond by changing the expression of their regulatory feed intake genes.

Key words: nutrition, feed intake regulation, mRNA

ANEXO VII. Imagen de poster presentado en la Reunión Anual Conjunta ADSA®-AMPA-ASAS-CSAS-WSASAS del 15 al 19 de Julio de 2012, Phoenix, Arizona.