

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

EXPRESION EN MUSCULO DE GENES DEL EJE SOMATOTROFICO Y
ASOCIADOS A LA ADIPOGÉNESIS EN TERNEROS HEREFORD PUROS Y
CRUZA BONSMARA-HEREFORD AL NACIMIENTO

por

Ignacio ACHARD PICERNO
Carminia MELLO PAIVA
Juan Andrés PIRELLI SOUKHANOFF

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2010

Tesis aprobada por:

Director: -----
Ing. Agr. PhD.Mariana Carriquiry Fossemale

Ing. Agr. MSc. Gabriel Rovere

Ing. Agr. PhD. Ana C. Espasandin

Ing. Agr. Ana Laura Asstesiano Dickson

Fecha: 23 de diciembre de 2010

Autor -----
Ignacio Achard Picerno

Carminia Mello Paiva

Juan Andrés Pirelli Soukhanoff

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a nuestras familias que nos apoyaron incondicionalmente en nuestra formación como profesionales y como personas.

Especialmente a Jimena Laporta, Ana Laura Astessiano, Ana Espasandin y Mariana Carriquiry que nos enseñaron y nos acompañaron en este trabajo tanto desde el punto de vista formativo o profesional como humano, desinteresadamente.

A nuestros amigos y compañeros que nos acompañaron en este proceso, a Nicolás “Petaca” Gasparri y Pedro Mazzoni por su colaboración en el trabajo de campo, ah! Y a Pablo “El Gaucho” Ackermann por estar ahí.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u>	3
2.1 NUMERO DE FIBRAS.....	4
2.2 TAMAÑO DE FIBRAS.....	4
2.3 FACTORES QUE AFECTAN EL TAMAÑO Y NUMERO DE FIBRAS.....	5
2.3.1 <u>Género</u>	5
2.3.2 <u>Genotipo</u>	6
2.3.3 <u>Agentes promotores</u>	7
2.3.3.1 Esteroides.....	7
2.3.3.2 Myostatina.....	7
2.3.4 <u>Nutrición</u>	8
2.3.5 <u>Mediadores moleculares en el crecimiento muscular</u>	10
2.4 GRASA INTRAMUSCULAR.....	12
2.4.1 <u>Hiperplasia de los adipocitos</u>	12
2.4.2 <u>Hipertrofia de los adipocitos</u>	13
2.4.3 <u>Genes candidatos encargados de la hipertrofia de adipocitos</u>	14
2.4.3.1 Receptor activador de la proliferación de peroxisomas gamma.....	14
2.4.3.2 Proteína de unión del elemento regulador de esteroides	15
2.5 HIPOTESIS.....	16
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	17
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL, ANIMALES Y TRATAMIENTOS...	17
3.2 DETERMINACIONES.....	18
3.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ARN.....	19
3.4 PCR EN TIEMPO REAL.....	19
3.5 ANALISIS ESTADISTICO.....	21
4. <u>RESULTADOS</u>	22
4.1 PESO VIVO AL NACER.....	22
4.2 EXPRESION GENICA EN MUSCULO.....	22
5. <u>DISCUSION</u>	25

5.1 PESO VIVO Y GANANCIA DIARIA.....	25
5.2 EXPRESION GENICA EN MUSCULO.....	26
6. <u>CONCLUSIONES</u>	30
7. <u>RESUMEN</u>	31
8. <u>SUMMARY</u>	33
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	34
10. <u>ANEXOS</u>	52

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Composición química y disponibilidad del campo natural.....	17
2. Secuencia de nucleótidos de los primers utilizados.....	20
3. Peso y expresión génica la nacer en músculo <i>Semitendinoso</i> de terneros BH y HH, machos y hembras.....	24
Figura No.	
1. Relación entre el diámetro y número de fibras del músculo <i>Semitendinoso</i> en ganado Holstein Friesian. (Wegner et al., citado por Rehfeldt et al., 1999).....	5
2. Efectos de la nutrición maternal en el desarrollo fetal del músculo esquelético (adaptado de Du et al., 2009)	9
3. Ubicación de músculo <i>Semitendinoso</i>	18
4. Electroforesis control de calidad del ARN total.....	19
5. Evolución de peso vivo de terneros BH y HH desde el nacimiento hasta los 90 días.....	22

1. INTRODUCCION

En el Uruguay, la producción de carne bovina es el rubro más importante del sector pecuario constituyendo el 22% de las exportaciones totales del Uruguay para el año 2008 (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2009). En los últimos años se ha producido un crecimiento exponencial del área agrícola (600 vs. 1600 miles de has 2000 y 2008 respectivamente) desplazando la ganadería a zonas marginales desde el punto de vista edáfico y climático (suelos superficiales y zonas de estrés térmico) y concentrándose la misma en el norte y este del país. Sumado a ello, en lo que respecta a la cría vacuna los coeficientes productivos del país se han mantenido en niveles bajos y constantes en las últimas décadas (64% de destete y primer entore a los tres años de edad), lo que presenta una amenaza a la pecuaria nacional dada la alta tasa de extracción y el bajo incremento del stock vacuno.

Las opciones frecuentemente ofrecidas para paliar esta situación se centran en la mejora en la oferta y calidad del forraje (con pasturas sembradas o mejoradas) o en su utilización, a través del manejo del estado corporal de las vacas y de la altura de la pastura. Otras alternativas como destetes temporarios o precoces, requieren medidas de manejo adicionales y muchas veces son resistidas por el productor. No obstante, estas herramientas propuestas se enmarcan dentro de modificaciones puramente ambientales – que además- incrementan los costos de producción tornándola en inferioridad de condiciones respecto a otros rubros más lucrativos (Espasandín, 2010).

Otra herramienta, que involucra el componente genético y que se puede usar para levantar estas restricciones son los cruzamientos. Para la producción de carne vacuna han demostrado su efectividad en aumentar la eficiencia de producción, a través del uso de la heterosis, o bien una mejora en la calidad del producto a través de la complementariedad entre razas (Gimeno et al., 2002).

En Uruguay, tradicionalmente la cría se ha realizado explotando a la raza Hereford. Esta raza se clasifica dentro de las llamadas líneas maternas, dados sus menores requerimientos de mantenimiento, así como su habilidad en destetar terneros moderadamente pesados. No obstante, los resultados obtenidos en la cría no son satisfactorios y su estancamiento en el destete revela una gran ineficiencia en el proceso de cría (Soca y Pereira, 2000).

Por otro lado al norte del río Uruguay existen condiciones climáticas que podrían estar siendo limitantes para las razas actualmente explotadas, especialmente en el norte del país en donde los indicadores de humedad y temperatura mantuvieron duraciones promedio entre 8 y 16 horas por día de estrés en bovinos productores de carne y leche de las razas utilizadas en el país (Saravia y Cruz, 2003). El uso de recursos genéticos capaces de sobrellevar con menor estrés, condiciones de temperatura y humedad aliado a un menor uso de medicamentos podría derivar en mayores indicadores

en las fases de cría e invernada, así como disminuir los costos de producción asociados al uso de productos veterinarios (Espasandín, 2010).

En particular, la raza Sudafricana Bonsmara seleccionada con énfasis en su adaptación al medioambiente pastoril del subtrópico, es una de las alternativas disponibles. La misma fue creada en 1937 en Mara, Sudáfrica, por el zootecnista Jan C. Bonsma. Esta raza combina la productividad de las razas británicas, al principio Hereford y Shorthorn y posteriormente Sussex, Red Angus y South Devon, según los planteos de absorción de los distintos ganaderos, con la capacidad de adaptación a ambientes tropicales del Afrikáner, hacienda Bos Taurus de origen Europeo (ganado Sanga) emigrado al continente africano hace más de diez mil años. Generalmente se considera que la raza esta compuesta por las siguientes proporciones 5/8 Afrikaner, 3/16 Hereford y 3/16 Shorthorn (Espasandín, 2010).

Algunas de las características que la hacen candidata para las condiciones de producción nacionales son: pelo corto, piel pigmentada, cuero grueso bien vascularizado, subcutáneo móvil, lo hacen un animal adaptado a condiciones de altas temperaturas, posee una eficaz repelencia a garrapatas y resistencia natural a parásitos internos. Otras características no se verían modificadas con respecto a las razas utilizadas actualmente, tales como requerimientos, largo de gestación, facilidad de terminación y calidad de carne (Espasandín, 2010).

En dicho contexto, y dentro del proyecto que tiene como objetivo caracterizar el crecimiento y adipogénesis intramuscular en terneros de distintos grupos genéticos (puros Hereford y cruza Bonsmara x Hereford), en este trabajo se determinó la expresión (ARNm) de genes del eje hormona de crecimiento (GH) – factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y asociados a la adipogénesis en músculo *Semitendinoso* de terneros, machos y hembras, de los grupos genéticos ya mencionados, y su relación con el crecimiento en la etapa postnatal-predestete y con el peso vivo de los terneros hasta el destete.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

Antes que el músculo se convierta en carne (mientras el animal se encuentra vivo), el tejido muscular esquelético se encarga de la importante tarea de mantener el cuerpo y de la locomoción. Así, debido a que el tejido muscular constituye más del 40% de la masa muscular magra, el crecimiento y desarrollo del tejido muscular esquelético es uno de los componentes más importantes del crecimiento corporal (te Pas et al., 2004). Así mismo la producción de carne depende del crecimiento y desarrollo, en particular del tejido muscular.

Tanto el crecimiento como el desarrollo son resultantes de una serie de cambios anatómicos y fisiológicos complejos que ocurren en el organismo animal, y a través de los cuales se opera la transformación de una única célula en un animal adulto típico de la especie (te Pas et al., 2004).

Hammond (1960) entiende por crecimiento el aumento de peso experimentado por los animales desde el nacimiento hasta su estabilización en la edad adulta, y por desarrollo las modificaciones que experimentan las proporciones, conformación, composición química corporal y funciones fisiológicas del animal a medida que avanza la edad. Aunque ambos fenómenos pueden producirse simultáneamente, es posible que un individuo se desarrolle (aumente su largo y alto) sin experimentar alteraciones en su peso (crecimiento) o un individuo adulto (que ha terminado su desarrollo) aumente su peso por engorde (crecimiento) (Bavera et al., 2005).

Comprender el crecimiento muscular y sus componentes, así como los momentos en los que se definen, han sido objeto de estudio de la investigación internacional. Esto es debido a la gran importancia que posee conocer los procesos que definen y regulan el tamaño y composición de la masa muscular. Es por esto que se ha tratado de comprender las interacciones entre el crecimiento muscular y los factores que lo afectan, ya sea la composición genética del animal, el ambiente materno durante la gestación y postparto, el sexo, actividad de contracción, nutrición, innervación, hormonas y factores de crecimiento, entre otras (Rehfeldt et al., 1999).

La masa muscular está compuesta por fibras musculares, tejido adiposo, tejido conectivo, redes capilares y fibras nerviosas, que hacen que el músculo funcione como una unidad fisiológica (Rehfeldt et al., 1999). Los componentes más importantes de la masa muscular son el número de fibras que la componen y el tamaño de las mismas. A mayor número de fibras musculares y de tamaño moderado, se obtiene mayor calidad y cantidad de carne (Rehfeldt et al., 2000). Otros de los componentes que se sabe afecta la calidad de carne es el contenido de grasa intramuscular, la cual está directamente relacionada con la adipogénesis que se da en el músculo.

2.1 NÚMERO DE FIBRAS

El número de fibras de un músculo dado ha mostrado ser de gran importancia para el crecimiento potencial del músculo esquelético, la resistencia física y adaptabilidad al estrés ambiental y, en animales de granja mejora la cantidad y calidad de carne post-sacrificio (Rehfeldt et al., 1999).

Durante el desarrollo embrionario los mioblastos se desarrollan a partir de células precursoras de la miogénesis de origen mesodérmico, las cuales se diferencian y fusionan para formar la fibra muscular. La extensión del período de multiplicación durante la miogénesis prenatal determina cuantas células musculares se forman. Las fibras primarias se forman durante la etapa inicial de la miogénesis; mientras que las fibras secundarias se forman durante la segunda ola de maduración y representan la mayoría de las fibras musculares (Beermann et al., 1978). Esta segunda ola de maduración, se superpone parcialmente con la formación de adipocitos intramusculares y fibroblastos; estos tres tipos de células producen la estructura básica del músculo esquelético (Du et al., 2009).

A partir de mioblastos se generan además células no fibras, conocidas como células satélites que permanecen en la cercanía de las fibras y juegan un rol fundamental en el crecimiento posnatal. Por lo tanto, el número de fibras está determinado principalmente por factores genéticos y por los factores ambientales capaces de afectar la miogénesis prenatal o hiperplasia, y en consecuencia se mantiene inalterada luego del nacimiento en la mayoría de las especies (Stickland 1986, Rehfeldt et al. 2000). En algunas especies como ratones y cerdos, incrementos en el número aparente de fibras después del nacimiento, está dado mayormente por la elongación de miotubos ya existentes (Swatland 1975, Rehfeldt y Fiedler 1984, Fiedler et al. 1998).

2.2 TAMAÑO DE FIBRAS

El crecimiento postnatal de la masa muscular está dado por el aumento en longitud y diámetro de la fibra, proceso conocido como hipertrofia. Para que la misma se lleve a cabo, la célula debe aumentar el número de mionúcleos, y al no tener la capacidad de dividirlos por sí misma, se necesita una fuente de ADN externa a la fibra, la cual es aportada por las células satélite que rodean a la fibra (Dayton y White, 2008). Por lo tanto la hipertrofia es acompañada por la actividad de proliferación de las células satélites (Rehfeldt et al., 2000). Existen factores que pueden estimular la proliferación de dichas células como lo son los esteroides (Bhasin et al. 2001, Shina-Hiikn et al. 2003) y el IGF de tipo I (Etherton, 2004).

El crecimiento potencial de las fibras es inverso al número de las mismas, por lo tanto es de esperar que a mayor número de fibras, estas serán más pequeñas (Figura 1). Sin embargo, existen situaciones en las que coexiste un alto número de fibras con

gran tamaño, debido a que el coeficiente de correlación entre estos valores no es exactamente -1 (Rehfeldt et al., 2000).

Este antagonismo entre número y tamaño de fibras musculares podría ser explicado por la menor cantidad de energía asignada para el crecimiento de cada fibra individual al aumentar el número de fibras (Rehfeldt et al., 2000).

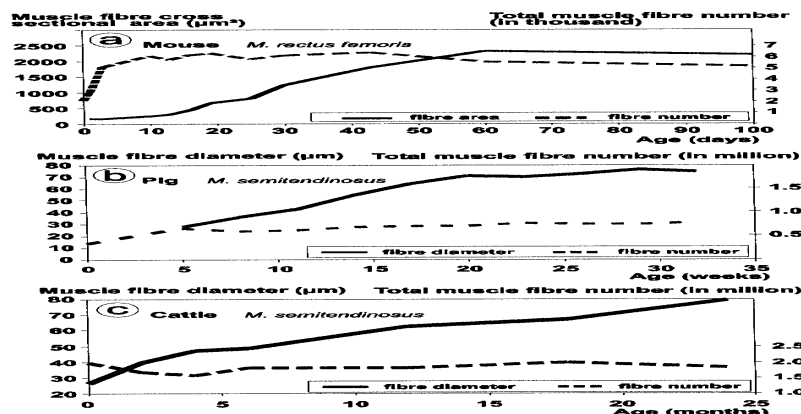


Figura 1. Relación entre el diámetro y número de fibras del músculo *Semitendinoso* en ganado Holstein Friesian (Wegner et al., citados por Rehfeldt et al., 1999).

2.3 FACTORES QUE AFECTAN EL TAMAÑO Y NÚMERO DE FIBRAS

2.3.1 Género

Papstein et al. (1999) encontraron que machos enteros poseen fibras más grandes que castrados y hembras. Así mismo, estos autores reportaron mayor número de células en machos que en hembras.

Las diferencias entre sexos esta dada por el control que ejerce la testosterona. Un aporte posnatal tardío, estimula directa o indirectamente la proliferación de células satélite y la síntesis de proteína muscular sin incrementar el número de fibras (Spencer 1985, Florini 1987, Spencer y Robinson 1993, Rehfeldt et al. 1994). A partir de esta acción y conociendo los eventos de la biogénesis, se puede concluir que las diferencias en número de fibras musculares entre machos y hembras se pueden atribuir a una acción hormonal, si las diferencias en hormonas androgénicas son lo suficientemente altas durante la formación de las fibras en el período prenatal. También pueden haber diferencias debido a patrones de actividad y otros factores que no están claros (Rehfeldt et al., 1999).

Además la testosterona alarga las fibras musculares permitiendo que aumente el número de células en la sección transversal (Maltin y Plastow, citados por te Pas et al., 2004).

Por otra parte comparaciones de niveles ARNm IGF-I en el músculo esplénico de corderos mellizos castrados y enteros mostraron niveles más altos de ARNm IGF-I en músculos de los enteros (Mateescu y Thonney, 2005). Campbell y Taverner (1985) encontraron en cerdos, que machos castrados tienen una inherente baja capacidad de deposición de proteína y un alto nivel de acumulación de grasa.

2.3.2 Genotipo

El coeficiente de heredabilidad del número de fibras musculares se encuentra entre 0,12 y 0,88 (mayoritariamente encontrándose entre 0,2 y 0,5) (te Pas et al., 2004). En particular, Osterc (1974) trabajando en ganado, encontró que en el músculo *Longissimus*, la heredabilidad del número de fibras es de 0,35, y para tamaño de fibra (diámetro) es de 0,74.

Si bien la variabilidad y heredabilidad genética son suficientemente altas para usar número de fibras y tamaño como criterios de selección (Rehfeldt et al., 1999), el número de fibras musculares no es determinado exclusivamente por factores genéticos, como había sido presumido previamente, debido a que es relativamente constante durante el período posnatal (Rehfeldt et al., 2000).

Existe evidencia que la selección por tasa de crecimiento o tamaño corporal genera aumentos tanto en tamaño como en número de fibras, a pesar de que la selección por proteína y masa muscular, que se llevan a cabo en varios programas modernos de cría, conduce mayormente a aumentos en tamaño de fibra (Rehfeldt et al., 1999).

La selección por crecimiento lleva a incrementos en mioblastos y/o tasa de proliferación de células satélite, según lo indica el mayor número de mionúcleos, mayor síntesis de ADN y mayor contenido de ADN total del músculo. Mas fibras musculares se forman y no hay cambios en la relación ADN/ proteína muscular (Martin y White 1979, Champion et al. 1982, Penney et al. 1983, Brown y Stickland 1993).

Existe evidencia que reporta que la respuesta en hipertrofia y/o proliferación depende de la medida en que la selección aplicada produce cambios en el sistema hormonal, especialmente en el eje de la GH-IGF-I (Rehfeldt et al., 1999). El IGF-I es un importante factor de crecimiento que estimula la proliferación de mioblastos y células satélite (White y Esser 1989, Florín et al. 1991). La selección por mayor tasa de crecimiento en cerdos, ha sido reportada por estar asociado con incrementos en los niveles de la GH en el plasma (Lund-Larsen y Bakke 1975, Norton et al. 1989, Clutter et al. 1995). Por lo tanto, la selección por aumento en la tasa de crecimiento podría actuar en los niveles de GH, lo que induciría la expresión de IGF-I, la cual induce la miogenina (Mangiacapra et al., 1992), proteína reguladora de la expresión génica en el músculo (Freeman et al., 2007).

El gen IGF-I es un gen candidato para estrategias de selección asistida por marcadores ya que ha sido reportado el polimorfismo de un solo nucleótido en la región del promotor (IGF-I/SnaBI), por estar asociado a distintas performances de producción en muchas razas carniceras (De la Rosa Reyna et al., 2010).

2.3.3 Agentes promotores

2.3.3.1 Esteroides

Está bien establecido que tanto andrógenos como estrógenos aumentan significativamente la eficiencia de conversión del alimento, la tasa de ganancia y el crecimiento muscular de ganado en confinamiento. Consecuentemente los implantes de esteroides anabólicos han sido ampliamente utilizados como promotores del crecimiento durante mucho tiempo (Dayton y White, 2008). Se han identificado receptores tanto de andrógenos como de estrógenos en las fibras musculares y en células satélites (Meyer y Rapp 1985, Kahlert et al. 1997, Lemoine et al. 2002a, Altuwajjri et al. 2004, Kamanga-Sollo et al. 2004, Sinha-Hikim et al. 2004, Mateescu y Thonney 2005).

Varias líneas de evidencia sugieren que los efectos de los esteroides anabólicos sobre el ARNm IGF-I en músculo, son directos. Estudios en humanos han demostrado que tratamientos con testosterona incrementan los niveles de ARNm de IGF-I en el músculo esquelético. (Gayan-Ramirez et al. 2000, Lewis et al. 2002).

Reafirmando la anterior, Pampusch et al. (2003) encontraron que los tratamientos con esteroides anabólicos incrementan los niveles de ARNm de IGF-I del músculo, y es probable que esto sea en parte responsable del aumento de número de células satélites, aumentos en núcleos de miofibras, aumentos en la hipertrofia e incrementos en el crecimiento muscular observados en los tratamientos con esteroides tanto en humanos como en animales. En bovinos, la expresión incrementada de ARNm de IGF-I es en parte responsable por el aumento de la proliferación observado en respuesta a los tratamientos con estradiol (E2) o acetato de trembolona (TBA) en cultivos de células satélite (Dayton y White, 2008).

En contraparte ninguno de los tratamientos con E2 o TBA afectó la abundancia de ARNm de myostatina, IGFBP-3, o factor de crecimiento hepático en cultivos de células satélite bovinas (Kamanga-Sollo et al., 2004).

2.3.3.2 Myostatina

La myostatina es otro importante regulador del crecimiento muscular, al punto que una mutación en el gen de myostatina induce el fenotipo doble musculado en bovinos (McPherron y Lee, 1997). Hasta la fecha no está claro si el gen de myostatina

está regulado nutricionalmente y si juega un rol en retardar el crecimiento muscular postnatal causado por la desnutrición prenatal (Bayol et al., 2004).

2.3.4 Nutrición

El crecimiento normal depende de la adecuada administración de nutrientes y la presencia de factores de crecimiento. Los nutrientes están involucrados, no sólo como fuente de energía (aminoácidos, grasas e hidratos de carbono) o sustratos para la síntesis de nuevas proteínas (aminoácidos), sino que también cumplen un papel en la regulación del crecimiento y la síntesis de proteínas mediante la interacción con el eje GH-IGF del sistema (Dauncey et al., 1996).

Ha sido reportado (Davenport et al., citados por te Pas et al., 2004) que la nutrición es un importante factor regulador de la producción de IGF-I tanto durante la vida fetal como postnatal.

El período prenatal de desarrollo muscular es mucho más sensible a la deficiencia nutricional, porque en dicho período se establece el número de fibras o hiperplasia. La nutrición materna y/o disponibilidad de nutrientes parecen ser factores claves en la regulación de la miogénesis. Los mecanismos responsables de la influencia de la nutrición materna en la miogénesis fetal pueden involucrar alteraciones en los niveles de IGF (Dwyer y Stickland, 1992a) o en la morfología y eficiencia de la placenta (Dwyer et al., 1992b).

En ganado, la mayoría de las fibras musculares se forman entre el segundo y octavo mes de gestación (Russell y Oteruelo, 1981), y por lo tanto una restricción alimenticia que conlleve a una reducción en la formación de fibras musculares durante esta etapa, tiene consecuencias fisiológicas a largo plazo, irreversibles y negativas en la descendencia (Stannard y Johnson 2004, Zambrano et al. 2005, Zhu et al. 2006) y por lo tanto se considera la etapa más susceptible a la subnutrición materna.

Adicionalmente, la maduración del músculo esquelético se produce durante etapas tardías de gestación en ovinos y bovinos (105 y 210 días, respectivamente). Una restricción nutricional maternal luego de esta etapa no tiene mayor impacto en el número de fibras musculares; pero si reduce el tamaño de las fibras musculares fetales en ovinos (Greenwood et al., 1999) (Figura 2).

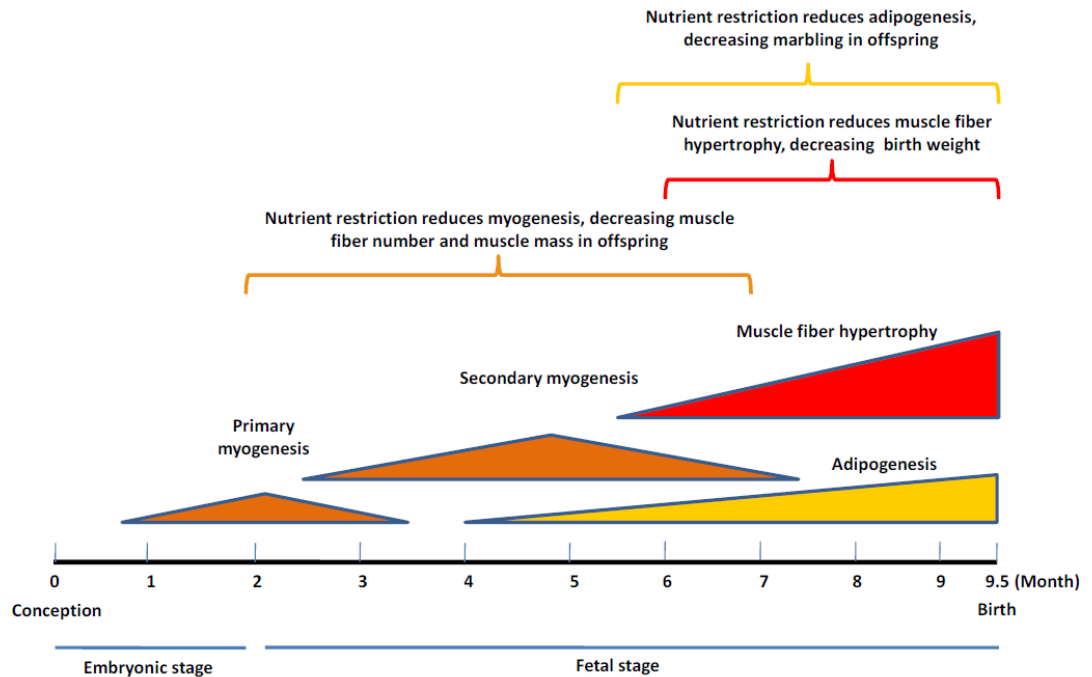


Figura 2. Efectos de la nutrición materna en el desarrollo fetal del músculo esquelético. Los datos fueron estimados principalmente basados en estudios en ovejas, roedores y humanos, y representan la progresión a través de varias etapas de desarrollo. Una restricción nutricional durante la mitad de la gestación reduce el número de fibras mientras que una restricción durante la gestación tardía reduce el tamaño de las fibras musculares y la formación de adipocitos intramusculares (adaptado de Du et al., 2009).

Es bien sabido que la malnutrición durante el crecimiento postnatal reduce el peso corporal incluyendo el peso del músculo esquelético. Restricciones en la alimentación, tanto en cantidad como en calidad (dietas deficientes en energía y proteína) llevan a detrimentos en el diámetro de las fibras musculares en varios roedores (Hansen-Smith et al. 1978, Goldspink y Ward 1979, Hegarty y Kim 1981, Rehfeldt et al. 1991), cerdos (Staun 1972, Stickland et al. 1975), ovejas (Joubert, 1956), ganado (Osterc y Zagozen 1977, Beerwinkle et al. 1979), monos (Deo et al., 1965) y humanos (Cheek et al., 1970). Las disminuciones en el tamaño de las fibras musculares son acompañadas por una reducción en el número de núcleos o contenido de ADN pero con aumentos en la relación ADN/proteína o ADN/citoplasma nuclear (Stickland et al. 1975, Tanaka et al. 1992, Schadereit et al. 1995).

En contraste con el tamaño de las fibras, se ha reportado que el número de fibras no se ve influenciado por una malnutrición postnatal en ratones post destete (Goldspink y Ward 1979, Rehfeldt et al. 1991) y ratas (Bedi et al. 1982, Tanaka et al. 1992, Schadereit et al. 1995), en cerdos (Staun 1972, Stickland et al. 1975), ganado (Osterc y Zagozen, 1977) y humanos (Cheek et al., 1970). Solo restricciones severas

(inanición) parecen causar pérdida de fibras, mientras que niveles moderados de subnutrición afectan exclusivamente la hipertrofia de las fibras por medio de la reducción de la acumulación proteica y nuclear.

2.3.5 Mediadores moleculares en el crecimiento muscular

La GH es el principal regulador del crecimiento somático postnatal, estimulando procesos anabólicos como la división celular, crecimiento óseo y síntesis proteica (Renaville et al., 2002). Ha sido durante mucho tiempo conocida por estimular el crecimiento de los tejidos como el de los huesos, pero uno de sus principales efectos sobre el músculo es disminuir el contenido de grasa por medio de la regulación de la oxidación de grasa (actividad lipolítica) (Spencer et al. 1994, Renaville et al. 2002). Adicionalmente la GH está involucrada en la inhibición del transporte de glucosa hacia tejidos periféricos (actividad diabetogénica) y en la regulación de la actividad de los ribosomas involucrados en la traducción, que en definitiva influye en la síntesis proteica (Goodman, 1993).

La proteína de unión de GH (GHBP), un producto secundario del gen del receptor transmembranal de la GH (GHR), correspondiente al dominio extracelular del GHR, puede también regular la acción de GH, tanto a nivel endócrino como local (Baumann, 1994). En roedores, el hígado es la principal fuente de GHBP en plasma a pesar de que la mayoría de los tejidos no hepáticos también expresan ARNm de GHBP (Tiong y Herington, 1991). La expresión de ARNm de GHBP en hígado de ratas aumenta con la edad (Tiong y Herington, 1991), similar a los aumentos observados en ARNm de GHR (Tiong y Herington 1992, Ymor y Herington 1992).

La GH se une al dominio extracelular del GHR, el cual se expresa en varios tejidos, especialmente en el tejido hepático. Este proceso es la señal para una cascada de eventos metabólicos intracelulares, culminando en la producción de IGF-I por los tejidos objetivo, de los cuales el hepático es el más importante (Renaville et al., 2002).

Se cree que GH ejerce su acción anabólica en el músculo a través de IGF-I sintetizada localmente, en vez de por la estimulación directa de las vías anabólicas. En apoyo a este mecanismo indirecto, GH exógena aumenta la expresión ARNm de IGF-I, pero no la expresión de ARNm de GHR o ARNm de IGF-II en *Longissimus* de cerdos neonatales (Lewis et al., 2000). La expresión de ARNm de GHR e ARNm de IGF-I es también sensible a la GH en el músculo *Semitendinoso* de cerdos en crecimiento (Brameld et al., 1996).

El sistema IGF consta de los factores IGF I y II, y está mediado por los receptores de IGF y las proteínas de unión de los IGF (IGFBP1-6) (Cohick y Chemmons 1993, Florini et al. 1996, Johnson et al. 1998, Brink et al. 2001). En los seres humanos y mamíferos seis proteínas de unión (BP) han sido caracterizadas que, además

de transportar el IGF en la circulación, actúan como moduladores fisiológicos y reguladores de las acciones de IGF (Mohan y Baylink, 2002).

El IGF-I es un mediador de muchos efectos biológicos; por ejemplo, aumenta la absorción de glucosa, estimula la miogénesis, participa en la activación del ciclo de los genes en las células, aumenta la síntesis de lípidos, estimula la producción de progesterona en células glandulares e interviene en la síntesis de ADN, ARN, proteínas, y en la proliferación de células (Eherton, 2004).

El IGF-I, como regulador de la miogénesis tienen un papel clave en el desarrollo muscular, pero sus efectos son dependientes de la etapa de desarrollo. En general, los efectos prenatales tienen que ver con la proliferación y diferenciación, donde actúa como regulador de la miogénesis estimulando la diferenciación mediante la inducción de la expresión del gen miogenina, con lo que la sobre expresión de miogenina es necesaria para la diferenciación terminal. Mientras que tras el nacimiento el efecto principal es sobre la hipertrofia (Dorup et al. 1991, Florini et al., citados por te Pas et al. 2004).

Estudios en los que la producción de IGF-I hepática fue bloqueada, resultó en una reducción del 75% de los niveles de IGF-I circulantes, sugiriendo que las fuentes hepáticas de IGF-I circulante no juegan un rol importante en el crecimiento (Sjogren et al. 1999, Yakar et al. 1999). Reafirmando lo anterior, los niveles de ARNm de IGF-I hepático no se correlacionaron bien con el desarrollo y crecimiento del cuerpo (Sjogren et al. 1999, Yakar et al. 1999). Sin embargo, el IGF-I producido por el músculo puede ser un potente regulador del crecimiento muscular vía autocrina o paracrina (Bayol et al., 2004).

En el mismo sentido, Bass et al. (1994) encontraron que la administración sistémica de IGF-I fracasó en alterar el crecimiento normal o el efecto incrementador de la GH, lo que indica un papel algo diferente de la IGF-I transmitida por la sangre en la estimulación del crecimiento. La aplicación de IGF-I exógena estimuló el crecimiento en ratas jóvenes (Hizuka et al., 1986) y la síntesis de proteínas en el músculo esquelético y en otros tejidos de cerdos neonatales (Davis et al., 2002).

Las IGFBPs modulan la interacción de IGFs con sus receptores estimulando o inhibiendo la misma, y por tanto controlan indirectamente su acción biológica. (Jones et al., 1995). La unión de IGF-I con IGFBPs aumenta la vida media en la circulación de 10-30 minutos a 12 horas y reduce la biodisponibilidad a los sitios de unión del receptor presente en los tejidos (Wang et al., 2005). El IGFBP más abundante en el suero es IGFBP-3, que une más del 90% de la IGF-I en la circulación (te Pas et al., 2004).

Los principales IGFBPs expresados en el músculo esquelético son IGFBP-3 IGFBP-4 e IGFBP-5. Sus funciones exactas en este tejido no están claras, pero

experimentos sobre expresión génica han demostrado que los niveles de ARNm de IGFBP-4 son mayores durante la proliferación de los mioblastos, mientras que ARNm de IGFBP-5, el cual no puede ser detectado en los mioblastos, se incrementa notoriamente en la estimulación de la diferenciación de miotubos por IGF- e insulina (Ewton y Florini, 1995).

En lo que respecta a IGFBP-3 ha sido demostrado que afecta el desarrollo muscular estimulando el pasaje de proliferación a diferenciación celular (Foulstone et al., 2003). Uno de los factores que regula principalmente la síntesis de IGFBP-3 es la GH (te Pas, 2004).

2.4 GRASA INTRAMUSCULAR

El contenido de grasa intramuscular, o marmoreo, en el músculo de bovinos de carne es un importante componente que influencia la calidad del alimento, como la terneza, la jugosidad y el sabor (Hovenier et al., 1993). La acumulación de grasa intramuscular está asociada con el genotipo, desarrollo y la nutrición del animal (Wang et al., 2005), y es determinada por el número y tamaño de adipocitos intramusculares (Du et al., 2009). El potencial de desarrollo celular de los adipocitos se cree que está determinado relativamente temprano en la vida del animal, y cambia de ahí en más ya sea en tamaño o en número de células en proporción al número inicial de células y proteínas lipogénicas (Kirkland y Dobson 1997, Caserta et al. 2001, Pethick et al. 2004).

La importancia de las primeras etapas de la vida en el desarrollo de la grasa intramuscular sugiere que sería posible predecir el contenido de grasa intramuscular en el adulto mediante el uso de medidas bioquímicas en el tejido muscular en etapas tempranas (Pethick et al., 2007).

2.4.1 Hiperplasia de los adipocitos

En rumiantes la adipogénesis comienza alrededor de la mitad de la gestación (Fève 2005, Gnanalingham et al. 2005, Muhlhausler et al. 2007). Tanto las células del músculo esquelético como los adipocitos derivan del mismo pool de células madre mesenquimales durante la etapa fetal a partir de las cuales la mayoría se desarrolla en células miogénicas. Sin embargo, una pequeña proporción de estas células en el músculo esquelético fetal se diferencian en adipocitos para formar los sitios de acumulación de grasa intramuscular que producen el marmoreo (Tong et al., 2009).

Para que un adipocito pueda asimilar lípidos, una célula mesodérmica como un fibroblasto, preadipocito o adipofibroblasto debe detener su proliferación y comenzar a expresar genes indicativos de la diferenciación del fenotipo adipocito. La proliferación celular y el subsecuente comienzo de la diferenciación son componentes de la adipogénesis. Alternativamente, la adipogénesis es detenida y comienza el metabolismo

de lípidos cuando una célula diferenciada (ahora llamada adipocito) comienza a acumular lípidos visibles en el citoplasma. Poco es conocido acerca de la apropiada regulación extrínseca e intrínseca de la adipogénesis en células de animales para carne destinadas a convertirse en adipocitos (Fernyhough et al., 2005).

Los adipocitos son células altamente especializadas cumpliendo la función de almacenaje, metabolismo y expulsión de lípidos. Desafortunadamente el patrón y la regulación del crecimiento normal de un adipocito permanecen todavía sin ser entendidos completamente. Estudios en animales y humanos han demostrado que el potencial de generar nuevas células adiposas es continuo a lo largo de toda la vida (Smas y Sul 1995, Prins y O'Rahilly 1997). Sin embargo los nuevos adipocitos generados tardíamente en la vida del animal están principalmente localizados en los depósitos grasos viscerales, retroperitoneales y subcutáneos, y son pocos los que se localizan en los depósitos intramusculares (Faust et al. 1978, Miller et al. 1984, Valet et al. 2002). Por lo tanto la adipogénesis en la etapa fetal tiene un efecto dominante en el número de adipocitos existentes dentro del músculo esquelético (Tong et al., 2008). Por otra parte, la reducción del número de adipocitos ocurre por apoptosis y posiblemente diferenciación (Prins y O'Rahilly, 1997).

Uno de los mecanismos propuesto es que el receptor activador de la proliferación de peroxisomas delta (PPAR δ) puede ser activado por ácidos grasos de cadena larga e induce la expresión de PPAR γ , el cual por activación específica promueve la diferenciación de los fibroblastos en adipocitos (Bastie et al., 1999).

Así como los adipocitos, los ácidos grasos por si mismos son también reguladores del metabolismo de ácidos grasos en cultivos de miocitos cardíacos de ratas neonatales, en este caso tanto el PPAR α como el PPAR γ se cree que están involucrados (Van der Lee et al., 2000).

2.4.2 Hipertrofia de los adipocitos

Durante la diferenciación de los adipocitos, los triacilglicéridos (TAG) se depositan continuamente en pequeñas gotas lipídicas que se unen en gotas más grandes. Este proceso progresa hasta que la mayoría del volumen celular es ocupado por una sola gota lipídica, lo que lleva a la hipertrofia. Todos los tejidos incrementan su masa debido a una combinación de hiperplasia e hipertrofia, pero la relación entre ambos procesos varía según los tejidos y dentro del mismo tejido de diferentes especies. En ganado, ovejas y cerdos la hipertrofia de las células adipocíticas puede llevar a un incremento de hasta mil veces su volumen (Mersmann, 1991). Durante las primeras 4 semanas después del nacimiento el volumen de los adipocitos subcutáneos se incrementa casi 9 veces en cerdos (Mersmann et al., 1997).

La síntesis de TAG en los adipocitos y también en los miocitos proviene de ácidos grasos sintetizados de novo o suministrados por la dieta. Los principales sitios para la síntesis lipídica son el hígado y el tejido adiposo, pero ocurren diferencias entre especies con respecto a la importancia relativa de cada tejido; siendo en bovinos el tejido adiposo el de mayor importancia. El metabolismo de las grasas de los adipocitos intramusculares es en parte idéntico al de los miocitos (te Pas et al., 2004).

2.4.3 Genes candidatos encargados de la hipertrofia de adipocitos

La hiperplasia e hipertrofia del tejido adiposo se lleva a cabo durante los períodos de engorde en el ganado de carne (Cianzo et al., 1985). Dichos autores han sugerido que la adipogénesis en ganado de carne, la cual incluye el proceso de diferenciación del preadipocito en un adipocito (hiperplasia) y la diferenciación terminal del mismo (hipertrofia), puede estar regulada por factores adipogénicos transcripcionales.

En casi todos los mamíferos el feto recibe a través de la placenta una dieta rica en carbohidratos pero muy pobre en grasa. Inmediatamente después del nacimiento el suministro materno de sustrato cesa abruptamente, y el recién nacido se alimenta en intervalos con leche, una dieta alta en grasa y baja en carbohidratos. Hacia el final del período de amamantamiento la leche es progresivamente remplazada por la dieta sólida del adulto, enriquecida en carbohidratos. La adaptación a estos cambios nutricionales requiere importantes modificaciones en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos en el hígado, dirigidos principalmente a través de variaciones hormonales, que se deben a la expresión diferencial de determinado grupo de genes. Alguno de estos genes se puede convertir en candidatos basándose en el conocimiento existente de su efecto sobre los procesos fisiológicos y bioquímicos (Bobard et al., 2004).

Uno de los complejos de genes ampliamente estudiado en diferentes especies ha sido el de PPAR, los cuales han demostrado participación en la regulación de los procesos de adipogénesis. También es importante mencionar que la familia de las proteínas de unión del elemento regulador de esteroides (SREBP) se encontraron asociadas a la composición de ácidos grasos en ganado negro japonés (Renaville et al., 2010). Otros resultados demostraron que PPAR γ y SREBP-1 cooperativamente juegan un rol clave en la regulación de la re-diferenciación de adipofibroblastos en bovinos, durante etapas de conversión temprana in vitro (Taniguchi et al., 2008).

2.4.3.1 Receptor activador de la proliferación de peroxisomas gamma

La diferenciación de los preadipocitos en adipocitos maduros es regulada por una cascada de factores de transcripción. Dos clases de factores de transcripción, CCAAT/incrementador de proteínas de unión(C/EBP) y PPAR γ , juegan un rol esencial durante la adipogénesis (Yamada et al., 2006).

Durante la primera etapa de la adipogénesis el C/EBP α es inducido y se une directamente al promotor del PPAR γ para inducir su expresión (Clarke et al. 1997, Wu et al. 1999). La expresión del PPAR γ promueve más la expresión del C/EBP α , generando un feedback positivo. La diferenciación terminal de un adipocito requiere la acción conjunta de PPAR γ y C/EBP. El PPAR γ puede estimular la diferenciación del adipocito por sí solo, pero no el C/EBP α (Rosen et al., 2002).

Por lo tanto, el PPAR γ es un importante regulador de la expresión génica y de la diferenciación de células grasas, desencadenando la conversión de pre-adipocitos, adipofibroblastos y fibroblastos en adipocitos diferenciados. Dicha expresión induce la conversión adiposa en porcinos (Auwerx, 1999), bovinos (Yen et al., 1997) y humanos (Ristow et al., 1998), así como células satélites.

El PPAR γ también incrementa el número de pequeños adipocitos con el incremento de la sensibilidad a la insulina sobre los adipocitos grandes (Spiegelman, 1998). Varias evidencias sugieren que mutaciones específicas en el dominio de unión del gen PPAR γ han sido propuestas por tener un rol esencial en el metabolismo de la glucosa y lípidos, y la homeostasis de la presión arterial en humanos (Stumvoll y Haring, 2002).

En función de esto, el gen PPAR γ parece jugar un importante rol en el proceso de crecimiento, en caracteres que se evalúa para calidad de carne (Yuan Fan, 2009).

2.4.3.2 Proteína de unión del elemento regulador de esteroides

Las SREBP son una familia de factores transcripcionales que regulan la homeostasis lipídica a través del control de la expresión de un rango de enzimas requeridas para la síntesis de colesterol endógeno, ácidos grasos, TAG y fosfolípidos. La familia SREBP está constituida por tres miembros: SREBP1a, SREBP1c y SREBP2, los cuales poseen diferentes roles en la síntesis lipídica (Eberlé et al., 2004).

En tejidos y órganos diferenciados SREBP2 juega un rol importante en la regulación de la síntesis de colesterol. Mientras que el SREBP1c está involucrado con ácidos grasos, y aparenta ser un mediador de la señal relación insulina/glucosa de la lipogénesis, además puede estar involucrado en la resistencia a la insulina, residuos de lipoproteínas e hígados grasos. Por otra parte, SREBP1a es expresada en células en crecimiento promoviendo la síntesis de colesterol y ácidos grasos que son requeridos para la síntesis de la membrana (Shimano, 2002).

Las SREBP son sintetizadas como precursores ligadas a la membrana con sus porciones n terminales activas entrando hacia el núcleo para activar los genes objetivos después de la escisión proteolítica, en un proceso regulado por el esterol. Este paso de

escisión es regulado por una molécula putativa que detecta esterol, la proteína activadora de SREBP (SCAP), que forma un complejo con la SREBP y se mueve entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (Shimano, 2002).

La expresión de SREBP-1c es autorregulada según el estado nutricional y hormonal del animal. En efecto, estudios previos han demostrado que la expresión de SREBP-1c es estimulada transcripcionalmente por la insulina (Horton et al. 1998, Foretz et al. 1999). In vivo, una reducción del ARNm de SREBP1c se observó en animales en ayuno, mientras que en ratones realimentados con una dieta rica en carbohidratos genera un fuerte aumento de la transcripción de SREBP1c (Horton et al., 1998). El SREBP1c ha sido visto como el mayor mediador de la acción de la insulina en la expresión de glucoquinasa y genes relacionados con la lipogénesis en hepatocitos cultivados de ratas (Foretz et al., 1999) e in vivo (Beard et al., 2001). En el hígado de animales adultos la insulina induce la transcripción de SREBP1c, pero también ha sido sugerido que la insulina aumenta la abundancia nuclear de SREBP1c (Shimano et al. 1996, Kim et al. 1998).

El procesamiento de los SREBP es controlado mayoritariamente por los contenidos celulares de esterol. Cuando los niveles de esterol disminuyen el precursor es roto para activar los genes colesterogénicos y mantener la homeostasis de colesterol. Este proceso sensible al esterol aparentemente es uno de los principales puntos de regulación de las isoformas 1a y 2, pero no la 1c, que parece estar principalmente regulada a un nivel transcripcional por la insulina. La propiedad única de activación-regulación de cada isoforma facilita la regulación coordinada de todos los bloques esenciales constructores de lípidos requeridos para la formación de membranas celulares así como lipoproteínas de muy baja densidad en los hepatocitos (Eberlé et al., 2004).

2.5 HIPOTESIS

La incorporación del componente Bonsmara en el genotipo de un animal Hereford se puede traducir en diferencias en la expresión de genes del eje somatotrófico, que se asocian a mayor PV al nacer y/o al destete. Por otra parte los terneros HH poseen mayor potencial de marmoreo, por lo tanto tendrán mayor expresión de los transcriptos relacionados a la adipogénesis.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL, ANIMALES Y TRATAMIENTOS

El experimento se realizó en la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (Paysandú, Ruta No. 3, km 386) de la Facultad de Agronomía, desde noviembre 2009 a febrero 2010, de acuerdo al protocolo de experimentación con animales aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República.

Se utilizaron terneros nacidos de vacas Hereford gestando terneros cruza Bonsmara x Hereford (BH, n=35) y terneros Hereford puros (HH, n=40). El diseño del experimento fue completamente al azar con un arreglo factorial de tipo genético y sexo de ternero. La fecha promedio de parición fue el 2/11/2009 \pm 30 días.

Durante el pre y posparto las vacas y los terneros fueron manejados en conjunto sobre un campo natural correspondiente a la región conocida como cretácico, la cual presenta una marcada estacionalidad en la producción del forraje dado el predominio de especies gramíneas estivales.

Desde el último tercio de gestación hasta el destete la oferta de forraje fue determinada mensualmente mediante la técnica de doble muestreo (Haydock y Shaw, 1975), para caracterizar el plano nutricional en el que se encontraban los animales durante dicho período (Cuadro 1). Se tomó una muestra representativa para la determinación de la composición química según AOAC (2001).

Cuadro 1. Composición química y disponibilidad del campo natural.

Fecha	22/9	21/10	11/11	14/12
Días al parto	-41	-12	9	42
Disponibilidad (kgMS/ha)	702	1146	3357	2331
Materia seca	88.3	89.4	91.9	90.6
Cenizas (%MS)	15.7	14.2	10.9	18.2
Proteína cruda (%MS)	16.7	11.8	7.8	7.9
Fibra detergente neutro (%MS)	52.1	67.9	65.9	61.5
Fibra detergente ácido (%MS)	21.7	26.3	32.0	31.0
Energía metabolizable (Mcal/kgMS)	2,7	2,5	2,4	2,4

La producción de leche promedio, determinada por ordeño mecánico (Quintans et al., 2010) fue para las madres lactando terneros BH de 8,2 kg/día, mientras que para las madres lactando terneros HH fue de 5,4 kg/día.¹

Los terneros fueron destetados mediante la técnica de destete precoz (Simeone et al., 2002) el día 1/2/2010, a los $90 \pm 13,5$ días de edad.

3.2 DETERMINACIONES

En los terneros se registró el peso vivo al nacer, a los 35 y a los 90 ± 13.5 días de edad (destete).

A una submuestra de 24 animales ($n = 7$ y 4 ; 8 y 5 para BH y HH, machos castrados y hembras, respectivamente) se les tomó muestras del músculo *Semitendinoso* al nacer (dentro de las primeras 72 horas post nacimiento), de acuerdo al siguiente procedimiento. Se ubicó la zona correspondiente al punto de unión del músculo *Semitendinoso* (Figura 1) con el músculo *Semimembranoso*, a 3 cm de este último y a 8 cm del hueso isquiún. Se desinfectó y limpió la zona con iodo y alcohol. Posteriormente se suministraron 5 cm^3 de un anestésico local (Lidocaína 2%), se hizo una incisión con bisturí de 5 cm de longitud y 2 cm de profundidad hasta llegar al músculo del cual se tomaron aproximadamente 2 cm^3 de muestra. Se procesó el tejido mediante sucesivos lavados en suero fisiológico y se congeló en nitrógeno líquido para luego conservarlo a -80°C hasta su posterior análisis (Anexo 1).

La elección de dicho músculo se debe a que el mismo es de fácil acceso, es un corte de gran valor (Peceto) y que posee gran correlación con otros cortes valiosos.

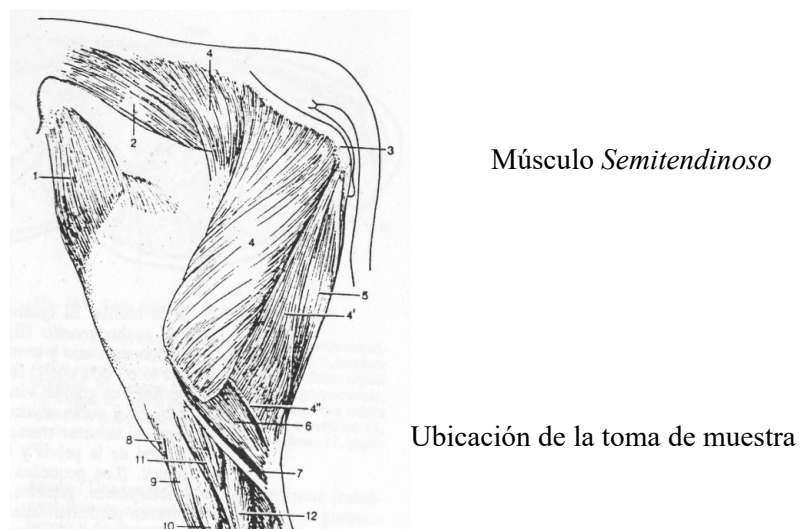


Figura 3. Ubicación de músculo *Semitendinoso*.

3.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL ARN

Álvarez, M.; Gomez, P.; Taullard, M. 2010. Crecimiento de terneros cruce Bonsmara-Hereford y Hereford puros contemporáneos en un sistema pastoril del norte de Uruguay (sin publicar).

La extracción de ARN total se realizó con TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA, EEUU), seguido por precipitación con cloruro de litio. Luego se realizó un tratamiento con ADNasa (DNase Free Kit™; Ambion, Austin, TX, EEUU), para eliminar restos de ADN contaminante. La concentración de ARN total se determinó mediante absorbancia a 260 nm y la calidad e integridad del ARN aislado se evaluó con las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 nm (NanoDrop ND-100 Spectro photometer Nanodrop Technnologies, Inc., Wilmington, DE); y por electroforesis (Figura 4) usando un gel de agarosa 1% (3 a 4 µg de RNA) (Anexo 2).

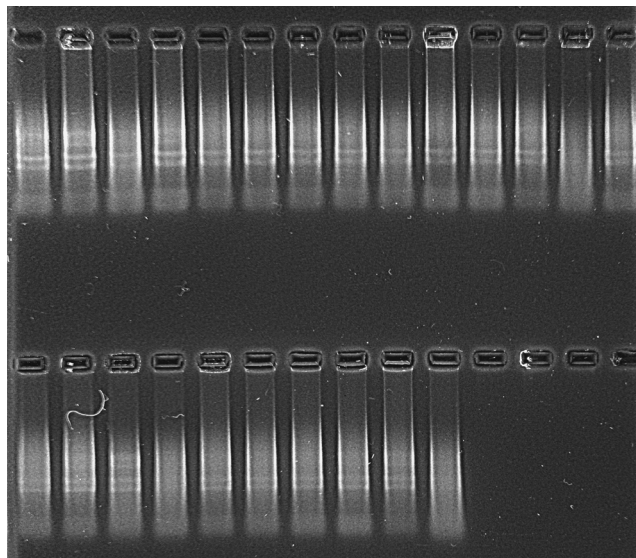


Figura 4. Electroforesis control de calidad del ARN total.

3.4 PCR EN TIEMPO REAL

La retrotranscripción se realizó utilizando el kit SuperScript®III (Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) con hexámeros no específicos y 1 µg de ARN. El ADNc que se obtuvo fue almacenado a -20° hasta su posterior análisis. Se utilizaron primers específicos para amplificar ADNc de los genes relacionados al eje GH-IGF (GHR, IGF-I, IGFBP3) y asociados a la adipogénesis (PPAR γ y SREBP1) y un control endógeno hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) (Cuadro 2).

El HPRT ha sido usado previamente como control endógeno en tejidos de rumiantes (Carriquiry et al., 2009) y su expresión fue determinada en las muestras de este estudio y probó ser un buen control interno debido a que no hubieron variaciones entre tipo genético y sexo.

Cuadro 2. Secuencia de nucleótidos de los primers utilizados.

Gen ¹	No. de Acceso ²		Secuencia	Largo (pb)B	Fuente
GHR	NM_176608	Sentido	TCTGGGAATCCTAAATTCACCAA	91	Wu (2007)
		Antisentido	CTGTAAACTGTGATTAGCCCCATCT		
IGF-I	XM_612412	Sentido	CCAGACAGGAATCGTGGATG	89	Wu (2007)
		Antisentido	ACTTGGCGGGCTTGAGAG		
IGFBP3	NM_174556	Sentido	AGCACAGACACCCAGAACTTCT	86	Wu (2007)
		Antisentido	TTCAGCGTGTCTTCCATTTCC		
PPAR γ	NM_181024	Sentido	CAGTGTCTGCAAGGACCTCA	128	Este trabajo
		Antisentido	GATGTCAAAGGCATGGGAGT		
SREBP 1	NM_00111302	Sentido	CTACATCCGCTTCCTTCAGC	93	Este trabajo
		Antisentido	TCCTTCAGCGATTTGCTTTT		
HPRT	XM_580802	Sentido	TGGAGAAGGTGTTTATTCCTCATG	105	Carriquiry et al. (2009)
		Antisentido	CACAGAGGGCCACAATGTGA		

¹GHR = receptor de la hormona de crecimiento, IGF-I = factor de crecimiento similar a la insulina -I, IGFBP3= proteína de unión 3 del factor de crecimiento similar a la insulina, PPAR γ = receptor activador de la proliferación de peroxisoma γ , SREBP1= proteína de unión 1 del elemento regulador del esteroles, HPRT= hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa.

²Número de acceso GenBank.

La abundancia de ARNm se midió por PCR en tiempo real, utilizando 7 μ l SYBR Green (Quantisys, Biotools B&M Labs, Madrid, España) y 3 μ l de ADNc diluido (1:7,5 en RNasa / DNasa libre de agua) en un volumen final de 15 μ l. Las muestras fueron analizadas en duplicado en un Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia) y las condiciones de amplificación fueron de 10 min. a 95° C y 40 ciclos, 15 min. a 95° C, 45 min. a 60° C y 20 min. a 72° C. Para la cuantificación absoluta se generaron curvas estándar (n=5 de 10⁶ a 10² copias de gen/ μ L) utilizando plásmidos que codificaban los genes de interés y el control endógeno. Para estimar el número de copias de ARNm de las muestras se utilizaron regresiones lineales. La expresión de los genes de interés fueron normalizados a la expresión del control endógeno (Carriquiry et al., 2009). La eficiencia de cuantificación para la expresión de ARNm fue de 110, 89, 92, 109, 115 y 109% para GHR, IGFBP3, IGF-I, SREBP1, PPAR γ y HPRT respectivamente. Mientras que los coeficientes de variación interensayo fueron 13, 7,8, 15,6, 22,6, y 6,1% para GHR, IGF-I, IGFBP3, PPAR γ y SREBP1 respectivamente.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó por medio del programa estadístico SAS (del SAS Institute).

Los datos de PV se analizaron en un diseño completamente al azar mediante un análisis de medidas repetidas utilizando el procedimiento MIXED con un modelo que incluyó tipo genético, sexo, edad y sus interacciones como efectos fijos. La fecha de nacimiento fue utilizada en el modelo como covariable y siendo la edad la medida repetida en el tiempo. Los datos de expresión génica se analizaron en un diseño de bloques al azar donde los animales fueron bloqueados por sexo y fecha de nacimiento. El modelo incluyó sexo, tipo genético y sus interacciones como efectos fijos, el bloque como efecto aleatorio y el intervalo nacimiento-biopsia como covariable.

Los datos fueron expresados como LSMeans \pm error estándar. Las medias se consideraron diferentes cuando $P \leq 0,05$ y una tendencia de diferir entre medias se estableció cuando $0,05 < P \leq 0,10$. La separación de medias se realizó con la prueba de mínima diferencia significativa. Las asociaciones entre las variables estudiadas se analizaron utilizando el procedimiento CORR.

4. RESULTADOS

4.1 PESO VIVO

El peso al nacer y al destete no fueron afectados por el tipo genético, el sexo de los terneros, ni su interacción. En promedio durante los primeros 90 días de edad los machos fueron más pesados ($P < 0,001$) que las hembras ($60,0$ vs. $57,8 \pm 0,4$ kg) pero existió una interacción entre sexo y tipo genético ($P = 0,021$) ya que si bien no se encontraron diferencias entre hembras de ambos genotipos, los machos BH fueron más pesados que los HH (Figura 5, Cuadro 3). Sin embargo, la ganancia diaria durante los primeros 90 d, no difirió entre los distintos grupos de terneros, promediando $0,659$ kg/d (Cuadro 3).

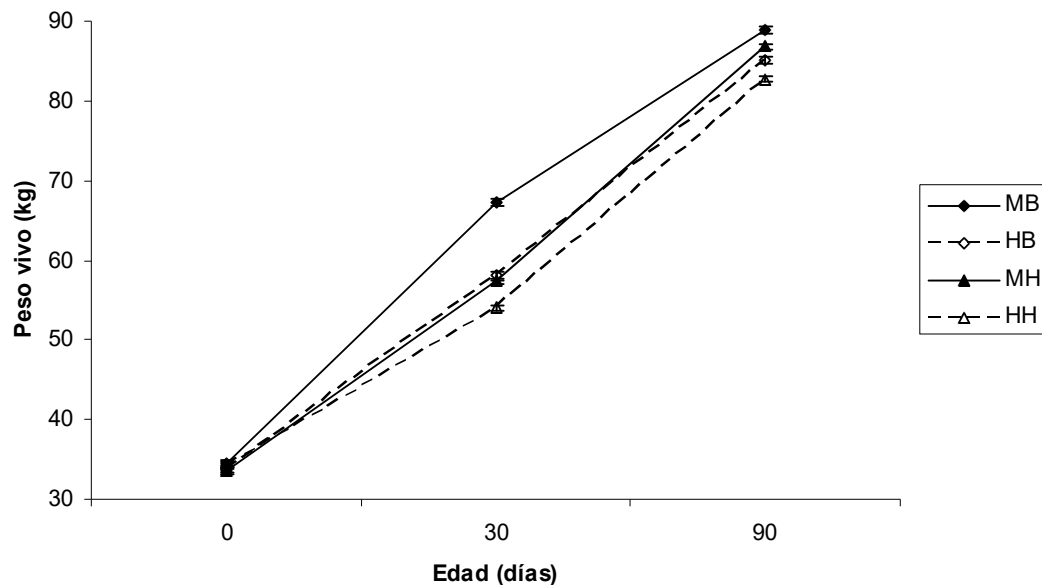


Figura 5. Evolución de peso vivo de terneros BH y HH, machos y hembras, desde el nacimiento hasta los 90 días de edad.

4.2 EXPRESIÓN GÉNICA EN MÚSCULO

La expresión de ARNm de GHR no fue afectada por el tipo genético y el sexo del ternero, ni su interacción. Sin embargo, la expresión de ARNm de IGF-I fue mayor ($P = 0,05$) en terneros HH que en BH. (Cuadro 3).

La expresión génica de ARNm de IGF1BP3 no fue alterada por el tipo genético, el sexo del ternero, ni por su interacción (Cuadro 3). Sin embargo, hubo un efecto del intervalo entre el nacimiento y la biopsia sobre la expresión de este transcrito,

disminuyendo en las primeras 72 horas de vida con una pendiente de -0,03 por día de aumento de dicho intervalo.

En lo que respecta a los genes vinculados a la adipogénesis, ninguna de las variables incluidas en el modelo tuvo efecto sobre la expresión de ARNm de PPAR γ . En contraste, la expresión de ARNm de SREBP1 fue mayor (P= 0,053) en HH que en BH, siendo este efecto mas evidente en machos que en hembras (Cuadro 3).

La expresión de ARNm de GHR estuvo alta y positivamente correlacionada con la expresión de ARNm de IGF-I ($r = 0,99$, $P < 0,001$) y de IGFBP3 ($r=0,98$, $P < 0,001$). Asimismo, la expresión de ARNm de SREBP1 y de PPAR γ estuvieron positivamente correlacionadas ($r= 0,54$, $P = 0,008$).

Cuadro 3. Peso y expresión génica la nacer en músculo *Semintendinoso* de terneros BH y HH, machos (M) y hembras (H).

	BH		HH		ESM	GG	Valor P ¹	
	M	H	M	H			S	GGxS
Peso vivo								
Al nacer	34,5	33,7	33,5	34,3	1,21	0,89	0,99	0,53
Al destete	88,8	85,1	86,8	82,7	3,53	0,56	0,27	0,96
Promedio 90 d (*)	60,6a	57,5c	59,4b	58,0c	0,39	0,37	<0,01	0,02
Ganancia diaria (0-90 d)	0,676	0,641	0,679	0,635	0,05	0,97	0,40	0,92
Expresión génica								
GHR	1,309	1,028	1,122	1,198	0,27	0,98	0,59	0,34
IGF-I	0,057b	0,050b	0,064a	0,066a	0,01	0,05	0,59	0,41
IGFBP3	0,284	0,245	0,278	0,332	0,05	0,46	0,89	0,39
PPAR γ	0,005	0,006	0,006	0,006	0,001	0,21	0,63	0,27
SREBP	1,081b	1,647ab	2,963a	2,267ab	0,60	0,05	0,92	0,31

¹. GG: genotipo, S: sexo, GGxS: interacción sexo-genotipo.

^{a,b} Medias seguidas por la misma letra no difieren con $P \leq 0,05$.

(*) Representado por LSMeans de las medidas repetidas.

5. DISCUSION

La información internacional disponible que incorpora el análisis de la expresión de genes relacionados al crecimiento y adipogénesis a nivel muscular entre diferentes razas bovinas, es escasa. Asimismo, a nivel nacional, el presente trabajo es el primero en abordar dicha temática y lo es además en comparar a este nivel, la raza más utilizada en el país (Hereford) con su cruzamiento con la raza Bonsmara.

5.1 PESO VIVO Y GANANCIA DIARIA

La ausencia de diferencias en PV al nacimiento de los terneros HH y BH encontrada en este trabajo, concuerda con lo reportado por Cundiff (2006) en la evaluación del MARC (Meat Animal Reserch Center; USDA, Nebraska, USA) en la cual utilizaron padres Hereford y Bonsmara sobre madres Brangus. Asimismo, Brown et al. (2009), también trabajando sobre madres Brangus, obtuvieron resultados similares, tampoco reportando, al igual que este trabajo, efecto del sexo del ternero sobre el PV al nacer.

En el presente trabajo, el PV al destete no difirió entre los distintos grupos de animales, coincidiendo con los resultados obtenidos por Brown et al. (2009) donde sobre pasturas naturales (56,7% digestibilidad en promedio), terneros curza Hereford x Brangus y Bonsmara x Brangus, mostraron performances similares. Sin embargo, cabe resaltar que en el trabajo anteriormente mencionado, solo los F1 Bonsmara (y no los F1 Hereford), difirieron de otras razas de peor desempeño productivo (Anexo 3).

A pesar de no haber encontrado diferencias de PV al nacer o al destete, en promedio los machos fueron más pesados que las hembras, y en particular, los machos BH fueron mas pesados los machos HH. El PV promedio expresaría mejor la diferencias en el PV entre los distintos grupos de animales ya que en el análisis de esta variable, se utilizan datos de PV al nacer, al mes y al destete como medidas repetidas para cada individuo, aumentando así el número de registros analizados por animal (tres registros por animal) y la precisión en la estimación (comparado con las restantes variables de PV que presentan un mayor error de estimación al considerar un solo registro por individuo). Esta diferencia, en PV promedio podría estar dada, en parte por el efecto de la testosterona durante la gestación, momento en el cual se produce la hiperplasia de fibras musculares, por lo que los machos presentarían mayor número de las mismas lo que se traduce en un mayor potencial de crecimiento de la masa muscular (Rehfeldt et al., 1999). Otro factor que puede estar explicando en parte la diferencia encontrada, es el hecho de que los terneros machos maman con más frecuencia que las hembras, según los resultados encontrados por Cartwright y Carpenter (1961). Sumado a esto, el mayor PV promedio de machos BH se podría asociar a los mayores registros obtenidos en

producción de leche de las madres amamantando dichos animales en el rodeo utilizado en el presente trabajo¹.

Las ganancias de PV obtenidas predestete (0 a 90 d), fueron buenas y similares entre grupo de animales. Schwarz et al. (1992) tampoco reportaron diferencias en ganancias de PV predestete entre sexos, sugiriendo que la diferencia en la tasa de crecimiento entre sexos se expresa más tardíamente. En particular, Govoni et al. (2003) reporta que para la raza Hereford, los machos enteros presentan una mayor tasa de crecimiento a partir de la semana 16 hasta el año de vida.

En lo que respecta a la performance esperada postdestete, Wang et al. (2009) utilizando madres Brangus, encontraron que las ganancias postdestete en condiciones de pastoreo sobre forrajes de buena calidad, variaba según la raza paterna y la producción de leche materna durante la lactancia. Basado en esta información donde se establecieron regresiones entre la producción de leche materna durante el amamantamiento y la ganancia diaria postdestete del ternero; se podría inferir que para las producciones de leche de las madres utilizadas en el presente trabajo, lactando terneros BH (8,2 kg/día) y HH (5,4 kg/día) los mismos tendrían una performance similar postdestete (Anexo 4).

5.2 EXPRESION GENICA EN MUSCULO

La unión de GH con su receptor (GHR) regula la expresión en músculo del IGF-I (Kraemer et al., 2009). En este sentido, Kraemer et al. (2009) reportan que a medida que aumentan los niveles de GH circulante aumenta la expresión de IGF-I en músculo, cuando existen receptores funcionales. Estos resultados estarían de acuerdo con la alta correlación encontrada entre la expresión de ARNm de GHR e IGF-I en el presente trabajo. Sin embargo, a pesar de que la expresión de IGF-I en el músculo *Semitendinoso* fue mayor en terneros HH que BH, la expresión de GHR no difirió entre los grupos de animales. Esta mayor expresión de IGF-I en terneros HH, podría estar asociada a mayores niveles de GH circulante o a diferencias en otros factores reguladores de la expresión de IGF-I en músculo no evaluados en este trabajo. En este sentido, la expresión de ARNm de IGF-I también es estimulada por los esteroides anabólicos (Pampusch et al., 2003); mientras que los glucocorticoides actuarían de modo contrario (Fernandez-Cancio et al., 2008). La mayor expresión de IGF-I en el músculo de terneros HH podría sugerir una mayor hipertrofia muscular (Florini et al. 1987, Dorup et al. 1991) asociado a una estimulación de la síntesis proteica en músculo esquelético (Hizuka et al. 1986, Davis et al. 2002). Por otra parte, mayores niveles de ARNm de IGF-I podrían no traducirse en mayores niveles de proteína IGF-I en músculo esquelético ya que los niveles de IGF en sangre no se asociaron directamente a cambios

1

en la expresión hepática de ARNm de GHR, GHR1a e IGF-I de vacas Angus puras y F1 Angus x Nelore en lactación temprana (Schneider et al., 2010).

Adicionalmente, la expresión de ARNm de IGF-I no fue diferente entre machos y hembras, lo cual coincide con lo encontrado por Laporta et al. (2009) quienes no reportan diferencias en la expresión muscular de este transcripto entre sexos al destete y por Govoni et al. (2002) quienes no encuentran diferencias en la concentración de IGF-I en suero entre machos y hembras hasta la semana 17 de vida.

La expresión de ARNm IGFBP3 en el músculo *Semitendinoso* no difirió entre tipos genéticos ni entre machos y hembras. De manera similar, la expresión muscular de este transcripto no difirió entre sexos en terneros al destete (Laporta et al., 2009) ni en ratones entre las 3 y 20 semanas de edad (Oliver et al., 2005). Coincidiendo con Laporta et al. (2009) la expresión de ARNm de IGFBP3 estuvo altamente correlacionada con la expresión de GHR, lo que estaría de acuerdo con los resultados que muestran que la síntesis de IGFBP3 está regulada por la acción de la GH (te Pas et al., 2004). Oliver et al. (2005) reportan que los niveles en el músculo esquelético de la proteína IGFBP3 se deben principalmente a la síntesis local de la misma; siendo esta la más abundante de las IGFBP3, a la tercer semana de vida en el músculo esquelético de ratones (Oliver et al., 2005). Sin embargo la expresión de dicha proteína en el músculo esquelético no está directamente relacionada con el crecimiento de este tejido; ya que en situaciones en que IGFBP3 es sobrepresada la tasa de crecimiento del músculo disminuye, según lo encontrado por Silha et al. (2002) en ratones. Este efecto depresor de la IGFBP3 sobre el crecimiento muscular es apoyado por la observación de que la misma suprime la proliferación de células miogénicas en cultivo (Pampusch et al. 2003, Xi et al. 2004). Por otra parte, Foulstone et al. (2003) reporta que IGFBP3 favorece el desarrollo muscular estimulando el cambio entre la proliferación y diferenciación de los mioblastos y Sadkowsky et al. (2009) comparando el perfil de expresión génica en el músculo de toros Limousin y Holstein-Friesian al año de edad, encontraron mayor expresión de ARNm de IGFBP3 y de la relación IGFBP3/IGFBP5 en toros Limousin, lo cual estuvo asociado a una mayor diferenciación de células musculares.

En el presente trabajo se encontró una disminución de la expresión de IGFBP3 durante las primeras 72 horas de vida. Consistentemente, Peng et al. (1996) trabajando con cerdos, también encontraron que con el avance de la edad los niveles de ARNm de IGF, IGFBP3 y del receptor de IGF-1 en el músculo esquelético disminuyen. Así también, Oliver et al. (2005) registraron que la abundancia de ARNm de IGFBP3 en el músculo esquelético de ratones disminuyó un 56% desde la 3 a la 20 semana de edad. La concordancia entre esta información y este trabajo cobra relevancia dada la similitud entre el músculo esquelético de los ratones y el de bovinos en lo que respecta a la expresión de IGFBP3 (White et al., 2003).

Hammond (1960) reporta que el tejido adiposo es el último en alcanzar la máxima velocidad de crecimiento y específicamente, la grasa intramuscular es la última en depositarse (7% vs. 43% de la composición corporal a los 3 y 39 meses respectivamente). Es así que cuando el total de grasa alcanza entre un 16-20% en un novillo de raza carnífera, solo un 3-6% de la grasa total corresponde a grasa intramuscular (Bavera et al., 2005). Sin embargo, el potencial para el desarrollo celular de los adipocitos parecería ser determinado en etapas relativamente temprana de la vida y el cambio a posteriori tanto en número como en tamaño de células ocurre en proporción al número inicial de células y proteínas lipogénicas (Kirkland y Dobson 1997, Caserta et al. 2001, Pethick et al. 2004).

Información reciente ha demostrado que tanto el PPAR γ como SREBP1, en cooperación, desempeñan un papel fundamental en la regulación de la formación de adipocitos en el músculo (Taniguchi et al. 2008, Renaville et al. 2010).

En el presente trabajo la expresión de PPAR γ al nacimiento, no fue diferente entre los distintos grupos de animales, lo que concuerda con Lehnert et al. (2007), quienes no encuentran una expresión diferencial de este transcrito en el músculo *Longissimus dorsi* entre las cruces Wagyu x Hereford (WH; alta capacidad de marmoreo) y Piedmontese x Hereford (PH; baja capacidad de marmoreo) al nacimiento. De manera similar, Wang et al. (2009) registraron diferencias en la expresión de este transcrito entre las cruces WH y PH recién a los 7 meses de vida, sugiriendo que la expresión de este transcrito acompaña la diferenciación de adipocitos, efecto que se marca con mayor énfasis en aquellos biotipos que poseen alto potencial de marmoreo. Sin embargo, cabe destacar que en este último trabajo, esta expresión diferencial en ARNm de PPAR γ entre cruces fue observada previo a encontrar diferencias en la deposición de grasa intramuscular, lo que resulta consistente con el hecho de que en etapas tempranas los contenidos de grasa intramuscular son bajos como para cuantificar diferencias a esos niveles (Bavera et al., 2005) pero que el potencial adipogénico se desarrolla a etapas relativas tempranas de vida lipogénicas (Kirkland y Dobson 1997, Caserta et al. 2001, Pethick et al. 2004).

El factor SREBP1 ha sido implicado en la activación de la transcripción de PPAR (Kim et al., 1998) lo cual estaría de acuerdo con la correlación encontrada en este trabajo entre estos dos transcritos. Los resultados del presente trabajo muestran que en esta etapa la expresión de SREBP-1 fue mayor en el genotipo HH que en BH. Los niveles de ARNm de SREBP1 se incrementan dentro las primeras 24 h luego de la inducción de la diferenciación de los adipocitos, indicando su importancia en las etapas tempranas de adipogénesis (Kim y Spiegelman, 1996). Este transcrito es responsable de la trans-activación de genes lipogénicos que codifican enzimas de la síntesis, desaturación y absorción de los ácidos grasos así como síntesis de triacilglicérols (Otto y Lane, 2005). En particular la expresión en músculo de la enzima esterol-CoA desaturasa (SCD), se ha relacionado con el potencial de adiposis intramuscular (Lehnert

et al., 2007); y a su vez dicha expresión es activada por SREBP1. Lehnert et al. (2007), encontraron una expresión diferencial del ARNm de SCD en el músculo *Longissimus dorsi* entre las cruas WH y PH al nacimiento. De manera similar, Ohsaki et al. (2007) reportaron diferencias en la expresión de SCD durante la diferenciación *in vitro* de adipocitos derivados de animales con mayor potencial (Wagyu) comparadas con otras de menor potencial de marmoreo (Holstein), sugiriendo que en parte esta diferencia fue debida a las diferencias encontradas en los factores de transcripción SREBP1 y C / EBP-alfa, que regulan la expresión de SCD.

Estos resultados sugieren una posible mayor adipogénesis intramuscular en HH en comparación con el grupo BH. Dicha aseveración se respalda en la información generada por Pordomingo et al. (2009) quienes trabajando con diferentes proporciones genéticas de la raza Bonsmara sobre Angus (BA), determinaron que el contenido de grasa intramuscular decrece con el aumento de la proporción de Bonsmara. Sin embargo, Pordomingo (2009) integrando la raza Hereford al análisis, no encontró diferencias en el porcentaje de grasa intramuscular en el músculo *Longissimus dorsi* entre novillos F1 BA y HH de novillos en confinamiento. Considerando que la raza Angus se encuentra en una posición superior que Hereford en cuanto a cantidad de grasa intramuscular (Mirzaei et al., 2010), los datos obtenidos para la F1 BA no serían directamente extrapolables, a nuestro entender, a los obtenidos para la F1 BH, utilizada en el presente trabajo.

Los resultados de este trabajo muestran que componentes del eje somatotrófico (IGF-I), así como relacionados con el potencial de adipogénesis (SREBP1), presentarían una expresión diferencial en el músculo *Semitendinoso* de terneros BH y HH en etapas de vidas tan tempranas como el nacimiento. Sin embargo, el impacto que estas diferencias puedan generar en etapas más tardías o a la faena deben investigarse en el futuro.

6. CONCLUSIONES

El PV al nacer no fue diferente entre terneros BH y HH pero el PV promedio durante los primeros 90 d de vida fue mayor en machos BH que HH, sin encontrarse diferencias entre hembras de ambos tipos genéticos.

La expresión de IGF-I fue mayor en el músculo de terneros BH que HH. Sin embargo no se encontraron diferencias entre tipos genéticos en la expresión de los otros componentes del eje somatotrófico (GHR e IGFBP3) evaluados.

La expresión de SREBP-1 fue mayor en terneros HH que BH, lo cual sugeriría un mayor potencial de adipogénesis en el músculo y por lo tanto mayor potencial de deposición de grasa intramuscular en el genotipo HH.

En caso de encontrarse ventajas en el uso de cruzamientos con la raza Bonsmara en características de interés productivo tales como lo son las vinculadas a la reproducción, adaptación a stress térmico y resistencia a parásitos internos y externos, la inclusión de la misma sería una opción más que válida, ya que no se esperarían cambios drásticos en las performance animal en términos de ganancia de peso o calidad de carne según los datos reportados en el presente trabajo.

En conclusión los resultados de este trabajo muestran que componentes del eje somatotrófico (IGF-I), así como relacionados con el potencial de adipogénesis (SREBP1), presentarían una expresión diferencial en el músculo *Semitendinoso* de terneros BH y HH en etapas de vidas tan tempranas como el nacimiento. Sin embargo, el impacto que estas diferencias puedan generar en etapas más tardías o a la faena deben investigarse en el futuro.

7. RESUMEN

La utilización de cruzamientos mejora la eficiencia de los procesos de producción debido a que se explota heterosis y complementariedad. Sin embargo, muy poco se conoce acerca de los genes encargados de la expresión de estos efectos. El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la cruce Bonsmara x Hereford sobre el peso vivo (PV) y la expresión muscular de genes relacionados con el crecimiento y adipogénesis muscular. Se utilizaron ternero/as nacidos de vacas Hereford inseminadas con toros Bonsmara (n=40) o Hereford (n=35) en un diseño de bloques al azar con un arreglo factorial de tipo genético (BH: terneros F1 Bonsmara x Hereford y HH: terneros Hereford) y de sexo (M: macho y H: hembra), bloqueados por fecha de nacimiento (intervalos menores a 7 días). Se registró el PV de los terneros al nacer, a los 30 y 90 días de edad. En una submuestra de 24 terneros (n= 7, 4, 7, 6 para BH-M, BH-H, HH-M, y HH-H, respectivamente) se tomaron al nacer (0 a 72 h) muestras del músculo *Semitendinoso* mediante biopsias. Se extrajo el ARN total y se determinó la abundancia de ARNm de receptor de hormona de crecimiento (GHR), factor de crecimiento similar a la insulina -I (IGF-I) y su proteína de unión-3 (IGFBP3), y de genes asociados a la adipogénesis (PPAR γ y SREBP1); mediante SYBR-Green RT-PCR en tiempo real, usando el gen hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (HPRT) como control endógeno. Los datos de PV y la expresión (número de moléculas) de los genes de interés en relación a la expresión de HPRT, fueron analizados usando el PROC MIXED (SAS Institute) con un modelo que incluyó el grupo genético, sexo y edad (si corresponde) del ternero y sus interacciones como efectos fijos, el bloque como efecto aleatorio y los días desde el nacimiento a la biopsia como covariable. El PV de los terneros no fue diferente al nacer. Sin embargo, en promedio durante los primeros 90 días de edad los machos fueron más pesados ($P < 0,001$) que las hembras ($60,0$ vs $57,8 \pm 0,4$ kg). Asimismo, existió una interacción entre sexo y genotipo ($P = 0,021$) ya que si bien no se encontraron diferencias entre hembras de ambos genotipos los machos F1 fueron más pesados que los puros Hereford. La abundancia de ARNm de HPRT no fue diferente ($P > 0,41$) debido al grupo genético, sexo o su interacción. La expresión de GHR e IGFBP3 no fue diferente ($P > 0,34$) entre grupos genéticos, sexos o por su interacción. Sin embargo, la expresión IGF-I en el músculo *Semitendinoso* fue mayor ($P = 0,05$) en HH que BH en ambos sexos. Sin embargo, la expresión de GHR e IGFBP3 no fue diferente ($P > 0,34$) entre grupos genéticos, sexos o por su interacción. Por otro lado, La expresión de IGFBP3 disminuyó ($P = 0,047$) en las primeras 72 horas de vida. En lo que respecta a los genes vinculados a la adipogénesis, ninguna de los efectos incluidos en el modelo afectó la expresión de PPAR γ al nacer. Pero la expresión de SREBP fue mayor ($P = 0,053$) en HH que en BH, siendo este efecto mas evidente en terneros machos. En conclusión los resultados de este trabajo muestran que componentes del eje somatrotrofico (IGF-I), así como relacionados con el potencial de adipogénesis (SREBP1), presentarían una expresión diferencial en el músculo *Semitendinoso* de terneros BH y HH en etapas de

vidas tan tempranas como el nacimiento. Sin embargo, el impacto que estas diferencias puedan generar en etapas más tardías o a la faena deben investigarse en el futuro.

Palabras clave: *Semitendinoso*; Cruzamientos; Bonsmara; Genes; Crecimiento.

8. SUMMARY

The use of crossbred improves the efficiency of production processes because it exploits heterosis and complementarity (Dickerson, 1969). However, little is known about the expression of genes associated of these effects. The aim of this experiment was to evaluate the effect of Bonsmara x Hereford cross on body weight (BW) on expression of genes related to muscle growth and adipogenesis. We used calves born from Hereford cows bred to bulls Bonsmara (n = 40) and Hereford (n = 35) in a randomized block design with a factorial arrangement of genotype (BH: F1 Bonsmara x Hereford calves and HH: Hereford calves) and sex (M: male and F: female). Calves were, blocked by date of birth (intervals of less than 7 days). The BW was recorded for calves at birth, 30 and 90 days old. In a subsample of 24 calves (n = 7, 4, 7, 6 for BH-M, BH-H, HH-M and HH-H, respectively) samples of *Semitendinosus*. were collected at birth (0 to 72 h) through muscle biopsies Total RNA was extracted and abundance of GHR, IGF-I, IGFBP3 mRNA as well as of genes associated with adipogenesis (PPAR γ and SREBP1 was determined by SYBR-Green realtime RT-PCR, using the gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) as an endogenous control. BW data and expression (number of molecules) of the genes of interest relative to HPRT expression were analyzed using PROC MIXED (SAS Institute) with a model that included genotype, calf sex and age (if corresponded) and their interactions as fixed effects, block as random effect and days from birth to biopsy as a covariate. Calf BW at birth was not different. However, on average during the first 90 days of age males were heavier (P <0.001) than females (60.0 vs. 57.8 \pm 0.4 kg). However, there was an interaction between sex and genotype (P = 0.021) as while no differences were found between females, BH males were heavier than HH males. The abundance of HPRT mRNA did not differ (P > 0.41) due to genotype, sex or their interaction. The expression of GHR and IGFBP3 mRNA did not differ (P > 0.34) between genotype, sex or their interaction. However, IGF-I mRNA expression in the *Semitendinosus* muscle was greater (P = 0.05) in HH than BH in both sexes. In relation to genes linked to adipogenesis, none of effects included in the affected PPAR γ expression of at birth. But the expression of SREBP1 was higher (P = 0.053) in HH than in BH, being this effect more evident in males. In conclusion, results from this work showed that components of the somatotropic axis (IGF-I) as well as related with adipogenesis potential (SREBP1) presented a differential mRNA expression in the *Semitendinosus* muscle of BH and HH calves as early in life as birth. However, the impact that these differences could have later on life or at slaughter have to been investigated in the future.

Key words: *Semitendinosus*; Crossbreeding; Bonsmara; Genes; Growth.

9. BIBLIOGRAFIA

1. ALTUWAIJRI, S.; LEE, D. K.; CHUANG, K. H.; TING, H. J.; YANG, Z.; XU, Q.; TSAI, M. Y.; YEH, S.; HANCHETT, L. A.; CHANG, H. C.; CHANG, C. 2004. Androgen receptor regulates expression of skeletal musclespecific proteins and muscle cell types. *Endocrinology*. 25: 27–32.
2. AUWERX, J. 1999. PPAR γ , the ultimate thrifty gene. *Diabetología*. 42: 1033–1049.
3. BASS, J. J.; HODGKINSON, S. C.; SPENCER, G. S. G. 1994. Effects of immunisation against insulinlike growth factors. In: Wood, P.R.; Willadsen, P.; Vercoe, J.E.; Hoskinson, R.M.; Demyer, J. eds. *Vaccines in agricul; immunological applications to animal health and production*. Melbourne, CSIRO. pp. 107–112.
4. _____.; OLDHAM, J. M.; HODGKINSON, S. C.; FOWKE, P. J.; SAUERWEIN, H.; MOLAN, P.; BREIER, B. H.; GLUCKMAN, P. D. 1999. Influence of nutrition and bovine growth hormone (GH) on hepatic GH binding, insulin-like growth factor- 1 and growth of lambs. *J. Endocr.* 126: 181–186.
5. BASTIE, C.; HOLST, D.; GAILLARD, D.; JEHL-PIETRI, C.; GRIMALDI, P.A. 1999. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor PPAR promotes induction of PPAR γ and adipocyte differentiation in 3T3C2 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 274: 21920–21925.
6. BAUMANN, G. 1994. Commentary; growth hormone-binding proteins, state of the art. *J. Endocr.* 141: 1–6.
7. BAVERA, G.; BOCCO, O.; BEGUET, H.; PETRYNA, A. 2005. Crecimiento, desarrollo y precocidad. (en línea). In: *Cursos de Producción Bovina de Carne (2005)*. Textos. UNRC. FAV. Consultado 18 nov. 2010. Disponible en <http://www.produccion-animal.com.ar>
8. BAYOL, S.; JONES, D.; GOLDSPINK, G.; NEIL, C. 2004. The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. *Stickland. Brit. J. Nutr.* 91: 331–339.

9. BECHET, D. M.; PERRY, B. N.; TOONG, A.; LOVELL, R. D. 1986. Oestrogen specific binding sites in bovine muscle nuclei. *J. Steroid Biochem.* 24:1127–1134.
10. BEDI, K. S.; BIRZGALIS, A. R.; MAHON, M.; SMART, J. L.; WAREHAM, A. C. 1982. Early life undernutrition in rats. 1. Quantitative histology of skeletal muscles from underfed young and refed adult animals. *Brit. J. Nutr.* 47: 417–431.
11. BEERMANN, D. H.; CASSENS, R. G.; HAUSMAN, G. J. 1978. A second look at fiber type differentiation in porcine skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* 46: 125-132.
12. BEERWINKLE, D. L.; MARCHELLO, J. A.; DRYDEN, F. D. 1979. Histological and histochemical characteristics of longissimus and semitendinosus muscle of feedlot and range steers. *J. Anim. Sci.* 48: 212.
13. BHASIN, S. L.; WOODHOUSE, R.; CASABURI, A. B.; SINGH, D.; BHASIN, N.; BERMAN, X.; CHEN, K. E.; YARASHESKI, L.; MAGLIANO, C.; DZEKOV, J.; DZEKOV, R.; BROSS, J.; PHILLIPS, I.; SINHA-HIKIM R.; SHEN AND STORER T. W. 2001. Testosterone dose-response relationships in healthy young men. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281: 1172–1181.
14. [BOBARD](#), A.; [HAINAULT](#), I.; [FERRÉ](#), P.; [FOUFELLE](#), F.; [BOSSARD](#), P.; 2004. Differential regulation of sterol regulatory element-binding protein 1c transcriptional activity by insulin and Liver X Receptor during liver development. *J. Biol. Chem.* 280: 199-206.
15. BRAMELD, J. M.; ATKINSON, J. L., SAUNDERS J. C., PELL J. M., BUTTERY P. J. AND GILMOUR R. S. 1996. Effects of growth hormone administration and dietary protein intake on insulin-like growth factor I and growth hormone receptor mRNA expression in porcine liver, skeletal muscle, and adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 74: 1832–1841.
16. BRINK, M.; PRICE, S.R.; CHRAST, J.; BAILEY, J.L.; ANWAR, A.; MITCH, W.E.; DELAFONTAINE, P. 2001. Angiotensin II induces skeletal muscle wasting through enhanced protein degradation and down-regulates autocrine insulin-like growth factor 1. *Endocr.* 142(4): 1489–1496.

17. BROWN, S.C.; STICKLAND, N.C. 1993. Satellite cell content in muscles of large and small mice. *J. Anat.* 183: 91-96.
18. _____; _____. 1994. Muscle at birth in mice selected for large and small body size. *J. Anat.* 184: 371-380.
19. CAFE, L. M.; GREENWOOD, P. L.; LEHNERT Y, S. A.; WANG, H.; BOWER, N. I.; REVERTER, A.; TAN, S. H.; DE JAGER, N.; WANG, R.; MCWILLIAM, S. M. 2009. Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle doi. *J. Anim. Sci.* 87: 119-130.
20. CAMPION, D. R.; MARKS, H. L.; RICHARDSON, R. L. 1982. An analysis of satellite cell content in the semimembranosus muscle of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) selected for rapid growth. *Acta Anat.* 112: 9-13.
21. CARRIQUIRY, M.; WEBER, W.J.; FAHRENKRUG, S.C. ; CROOKER, B.A. 2009. Hepatic gene expression in multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. *J. Dair. Sci.* 92(10): 4889 – 4900.
22. CARTWRIGHT, T. C.; CARPENTER, J. A. JR. 1961. Effect of nursing habits on clan weights. *J. Anim. Sci.* 20: 904.
23. CASERTA, F.; TCHKONIA, T.; CIVELEK, V. N.; PRENTKI, M. ; BROWN, N. F.; MCGARRY, J. D.; FORSE, R. A.; CORKEY, B. E.; HAMILTON, J. A.; KIRKLAND, J. L. 2001. Fat depot origin affects fatty acid handling in cultured rat and human preadipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280: 238–247.
24. CIANZO, D. S.; TOPEL, D. G.; WHITEHURST, G. B.; BEITZ, D. C.; SELF, H. L. 1985. Adipose tissue growth and cellularity; changes in bovine adipocyte size and number. *J. Anim. Sci.* 60: 970–976.
25. CLARKE, S. L.; ROBINSON, C. E.; GIMBLE, J. M. 1997. CAAT/ enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240: 99–103.
26. CLUTTER , A. C.; SPICER, L. J.; WOLTMANN, M. D.; GRIMES, R. W.; HAMMOND, J. M.; BUCHANAN, D. S. 1995. Plasma growth hormone, insulin-like growth factor I, and insulin-like growth factor

binding proteins in pigs with divergent genetic merit for postweaning average daily gain. *J. Anim. Sci.* 73: 1776–1783.

27. COHICK, W. S.; CLEMMONS, D. R. 1993. The insulin-like growth factors. *Annual Physiol. Rev.* 55: 131–153.
28. CUNDIFF, L.V.; FRANKE, D.E. 2006. Growth and puberty characteristics of topcross females by tropically adapted sire breeds in temperate and subtropical regions of the United States. *In: World Congress of Genetics Applied in Livestock Production (8th, 2006, Belo Horizonte, Brazil). Proceedings. s.n.t. 1 disco compacto. (Communication no. 32).*
29. CHEEK, D. B.; HILL, D. B.; CORNANDO, A.; GRAHAM, G. G. 1970. Malnutrition in infancy: changes in muscle and adipose tissue before and after rehabilitation. *Ped. Res.* 4: 135–144.
30. DAUGHADAY, W. H.; ROTWEIN, P. 1989. Insulinlike growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocrinol. Rev.* 10: 68–91.
31. DAUNCEY, M. J.; HARRISON A.P. 1996a. Developmental regulation of cation pumps in skeletal and cardiac muscle. *Acta Physiol. Scandinavica.* 156: 313–323.
32. _____; GILMOUR, R. S. 1996b. Regulatory factors in the control of muscle development. *Proc. Nutr. Soc.* 55: 543–559.
33. DAVIS, T. A.; FIORETTO, M. L.; BURRIN, D. G.; VANN R. C.; REEDS, P. J.; NGUYEN, H. V.; BECKETT, P. R.; BUSH, J. A. 2002. Acute IGF-I infusion stimulates protein synthesis in skeletal muscle and other tissues of neonatal pigs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283: 638–647.
34. DAYTON W. R.; WHITE M. E. 2008. Cellular and molecular regulation of muscle growth and development in meat animals. *J. Anim. Sci.* 86: 217-225.
35. DEO, M. G.; SOOD, S. K.; RAMALINGASWAMI, V. 1965. Protein deficiency, pathological features in rhesus monkey. *Arch. Pathol.* 80: 14–23.

36. DE LA ROSA REYNA, X. F.; MONTOYA, H. M.; CASTRELLÓN, V. V.; RINCÓN, A. M. S.; BRACAMONTE, M. P.; VERA, W. A. 2010. Polymorphisms in the IGF1 gene and their effect on growth traits in Mexican beef cattle. *Genetic and Molecular Res.* 9(2): 875-883.
37. DØRUP, I.; FLYVBJERG, A.; EVERTS, M. E.; CLAUSEN, T. 1991. Role of insulin-like growth factor I and growth hormone in growth inhibition induced by magnesium and zinc deficiencies. *Brit. J. Nutr.* 66: 505-521.
38. DU, M.; TONG, J.; ZHAO, J.; UNDERWOOD, K. R.; ZHU, M.; FORD, S. P.; NATHANIELSZ, P. W. 2009. Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *J. Anim. Sci.* 88: 32.
39. DWYER, C. M.; STICKLAND, N.C. 1992a. Does the anatomical location of a muscle affect the influence of undernutrition on muscle fibre number? *J. Anat.* 181: 373-376.
40. _____.; MADGWICK; CROOK, A. R.; STICKLAND, N. C. 1992b. The effect of maternal undernutrition on the growth and development of the guinea pig placenta. *J. Dev. Physiol.* 18: 295-302.
41. EBERLÉ, D.; HEGARTY, B.; BOSSARD, P.; FERRÉ, P.; FOUFELLE, F. 2004. SREBP transcription factors; master regulators of lipid homeostasis. *Bioch.* 86(11): 839-48.
42. ESPASANDIN, A. 2010. Un recurso genético de origen africano para la ganadería; la raza Bonsmara. *R. Esp. Rur.* 3: 14-18.
43. ETHERTON, T. D. 2004. Somatotropic function; the somatomedin hypothesis revisited. *J. Anim. Sci.* 82 (E-Suppl): 239-244.
44. EWTON, D. Z.; FLORINI, J. R. 1995. IGF binding proteins-4, -5 and -6 may play specialized roles during L6 myoblast proliferation and differentiation. *J. Endocrinol.* 144: 539-553.
45. FAUST, I. M.; JOHNSON, P. R.; STERN, J. S.; HIRSTH, J. 1978. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats; a new model of obesity. *Am. J. Physiol.* 235: 279-286.

46. FERNANDEZ-CANCIO, M.; ESTEBAN, C.; CARRASCOSA, A.; TORAN, N.; ANDALUZ, P.; AUDI, L. 2008. IGF-I and not IGF-II expression is regulated by glucocorticoids in human fetal epiphyseal chondrocytes. *Growth Hormone IGF Res.* 18(6): 497-505.
47. FERNYHOUGH, M. E.; BUCCI, L. R.; HAUSMAN, G. J.; ANTONIO, J.; VIERCK J. L.; DODSON, M. V. 2005. Gaining a solid grip on adipogenesis. *Tis. Cell.* 37: 335–338.
48. FEVE, B. 2005. Adipogenesis; cellular and molecular aspects. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 19: 483-499.
49. FIEDLER, I.; REHFELDT, C.; ENDER, K.; HENNING, M. 1998. Histophysiological features of skeletal muscle and adrenal glands in wild-type and domestic pigs during growth. *Arch. Anim. Breed.* 41: 489-496.
50. FLORINI, J. R. 1987. Hormonal control of muscle growth. *Msc. and Nrv.* 10: 577–598.
51. _____.; EWTON, D. Z.; MAGRI, K. A. 1991. Hormones, growth factors, and myogenic differentiation. *Am. Rev. Physiol.* 53: 201-216.
52. _____.; _____.; COOLICAN, S. A. 1996. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocrinol. Rev.* 17(5): 481–517.
53. FOULSTONE, E. J.; SAVAGE, P. B.; CROWN, A. L.; HOLLY, J. M. P.; STEWART, C. E. H. 2003. Role of insulin-like growth factor binding protein-3 (igfbp-3) in the differentiation of primary human adult skeletal myoblasts. *J. Cell Physiol.* 195: 70-90.
54. FOWLER, S. P.; CAMPION, D. R.; MARKS, H. L.; REAGAN, J. O. 1980. An analysis of skeletal muscle response to selection for rapid growth in quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Growth.* 44: 235-252.
55. GAYAN-RAMIREZ, G.; ROLLIER, H.; VANDERHOYDONC, F.; VERHOEVEN, G.; GOSSELINK, R.; DECRAMER, M. 2000. Nandrolone decanoate does not enhance training effects but increases IGF-I mRNA in rat diaphragm. *J. Appl. Physiol.* 88: 26–34.
56. GIMENO, D.; AVENDAÑO, S.; NAVAJAS, E.; LAMAS, A. 2002. Utilización de Cruzamientos como herramienta para el aumento del beneficio económico. In: Seminario de Actualización Técnica

Cruzamientos en Bovinos de Carne (1º, 2002, Tacuarembó, Uruguay).
Trabajos presentados. Tacuarembó, s.e. pp. 5-8.

57. GNANALINGHAM M. G.; MOSTYN, A. M.; SYMONDS, E.; STEPHENSON, T. 2005. Ontogeny and nutritional programming of adiposity in sheep; potential role of glucocorticoid action and uncoupling protein-2. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289: R1407-1415.
58. GOLDSPIK, G.; WARD, P. S. 1979. Changes in rodent muscle fibre types during postnatal growth, undernutrition and exercise. *J. of Physiol.* 296: 453–469.
59. GOODMAN, H. M. 1993. Growth hormone and metabolism. In: Schreibman, M. P.; Scanes, C. G.; Pang, P. K. T. eds. *The endocrinology of growth, development, and metabolism in vertebrates*. San Diego, Academic Press. pp. 93-115.
60. GREENWOOD, P. L.; SLEPETIS, R. M.; HERMANSON, J. W.; BELL, A. W. 1999. Intrauterine growth retardation is associated with reduced cell cycle activity, but not myofibre number, in ovine fetal muscle. *Reprod. Fertil. Dev.* 11: 281-291.
61. GROSSE, W. M.; KAPPES, S. M.; LAEGREID, W.W.; KEELE, J. W. 1999. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery and linkage mapping of bovine cytokine genes. *Mamm. Gen.* 10: 1062-1069.
62. HAMMOND, J. 1960. *Farm animals*. 3rd. ed. London, Edward Arnold Publishers. 322 p.
63. HANSEN-SMITH, F. M.; VAN HORN, D. L.; MAKSUD, M. G. 1978. Cellular response of rat quadriceps muscle to chronic dietary restrictions. *J. Nut.* 108: 248–255.
64. HAYDOCK, K. P.; SHAW, N. H. 1975. The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. *Austr. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 15: 663-670.
65. HEGARTY, P. V. J.; KIM, K.O. 1981. Effect of starvation on tissues from the young of four species with emphasis on the number and diameter of skeletal muscle fibers. *Ped. Res.* 15: 128–132.

66. HIZUKA, N.; TAKANO, K.; SHIZUME, K.; ASAKAWA, K.; MIYAKAWA, M.; TAKANA, I.; HORIKAWA, R. 1986. Insulin-like growth factor I stimulates growth in normal growing rats. *Europ. J. Pharm.* 125: 143–146.
67. HOVENIER, R. E.; KANIS, E.; VAN ASSELDONK, T.; WESTERINK, N. G. 1993a. Breeding for pig meat quality in halothane negative populations – a review. *Pig News and Info.* 14: 17–25.
68. _____.; BRASCAMP, W.; KANIS, E.; VAN DER WERF, J. H.; WASSENBERG, A. P. 1993b. Economic values of optimum traits; the example of meat quality in pigs. *J. Anim. Sci.* 71:1429–1433.
69. HWANG, C. S.; LOFTUS, T.M.; MANDRUP, S.; LANE, D. 1997. Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annual Rev. Cell Develop. Biol.* 13: 231–259.
70. JOHNSON, B. J.; HALSTEAD, N.; WHITE, M. E.; HATHAWAY, M. R.; DI COSTANZO, A.; DAYTON; W. R. 1998 Activation state of muscle satellite cells isolated from steers implanted with a combined trenbolone acetate and estradiol implant. *J. Anim. Sci.* 76(11): 779–2786.
71. JOHNSTON, D. J.; GRASER, H.-U. 2010. Estimated gene frequencies of GeneSTAR markers and their size of effects on meat tenderness, marbling, and feed efficiency in temperate and tropical beef cattle breeds across a range of production systems. *J. Anim Sci.* 88:1917-1935.
72. JOUBERT, D. M. 1956. Analysis of factors influencing postnatal growth and development of muscle fibre. *J. Agricul. Sci. Cambr.* 47: 59–102.
73. KAHLERT, S.; GROHE, C.; KARAS, R. H.; LOBBERT, K.; NEYSES, L.; VETTER, H. 1997. Effects of estrogen on skeletal myoblast growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232:373–378.
74. KAMANGA-SOLLO, E.; PAMPUSCH, M. S.; XI, G.; WHITE, M. E.; HATHAWAY, M. R. AND DAYTON, W. R. 2004. IGF-I mRNA levels in bovine satellite cell cultures; effects of fusion and anabolic steroid treatment. *J. Cell. Physiol.* 201:181–189.
75. KIM, J.B.; SPIEGELMAN, B.M. 1996. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Gen. Dev.* 10:1096–1107.

76. _____.; WRIGHT, H.M.; WRIGHT, M.; SPIEGELMAN, B.M. 1998. ADD1/SREBP1 activates PPAR γ through the production of endogenous ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:4333–4337.
77. KIRKLAND, J. L.; DOBSON D. E. 1997. Preadipocyte function and aging; links between age-related changes in cell dynamics and altered fat tissue function. *J. Am. Geriatr. Soc.* 45:959–967.
78. [KRAEMER, W. J.](#); [VINGREN, J. L.](#); [SCHUENKE, M. D.](#); [KOPCHICK, J. J.](#); [VOLEK, J. S.](#); [FRAGALA, M. S.](#); [HÄKKINEN, K.](#); [JEN-HO THOMAS, G. A.](#); [STARON, R. S.](#) 2009. Effect of circulating growth hormone on muscle IGF-I protein concentration in female mice with growth hormone receptor gene disruption. [Growth Horm IGF Res.](#) 19(3): 242-4.
79. LAPORTA, J.; ASTESSIANO, A. L.; SCARSI, A.; QUINTANS, G.; PÉREZ-CLARIGET. R.; CARRIQUIRY, M. 2009. Expresión génica a nivel muscular en terneros destetados de vacas primíparas suplementadas durante la gestación. *In: Reunión Bienal de la Asociación Latinamericana de Producción Animal (21ª, 2009, San Juan, Puerto Rico). Trabajos presentados.* San Juan, s.e. s.p.
80. LEHNERT, S. A.; REVERTER, A.;BYRNE, K. A.; WANG, Y.;NATTRASS , G. S.; HUDSON, N. J.; GREENWOOD, P. L. 2007. Gene expression studies of developing bovine longissimus muscle from two different beef cattle breeds. *BMC Dev. Biol.* 7:95.
81. LEMOINE, S.; GRANIER, P.; TIFFOCHE, C.; BERTHON, P. M.; RANNOU-BEKONO, F.; THIEULANT, M. L.; CARRE, F.; DELAMARCHE, P. 2002a. Effect of endurance training on oestrogen receptor α transcripts in rat skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 174:283–289.
82. LEWIS, A. J.; WESTER, T. J.; BURRIN, D. G.; DAUNCEY, M. J. 2000. Exogenous growth hormone induces somatotrophic gene expression in neonatal liver and skeletal muscle. *Am. J. of Physiol.* 278: R838–844.
83. LEWIS, M. I.; HORVITZ, G. D.; CLEMMONS, D. R.; FOURNIER, M. 2002. Role of IGF-I and IGF-binding proteins within diaphragm muscle in modulating the effects of nandrolone. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282:E483–E490.

84. LUND-LARSEN, T. R.; BAKKE, H. 1975. Growth hormone and somatomedin activities in lines of pigs selected for rate of gain and thickness of backfat. *Acta Agric. Scand.* 25: 231–234.
85. MCPHERRON, A. C.; LEE, S.J. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 12457–12461.
86. MALTIN, C. A.; DELDAY, M. I.; SINCLAIR, K. D.; STEVEN, J.; SNEDDON, A. A. 2001. Impact of manipulations of myogenesis in utero on the performance of adult skeletal muscle. *Reproduction.* 122: 359–374.
87. MANGIACAPRA, F. J.; ROOF, S. L.; EWTON, D. Z.; FLORINI, J. R. 1992. Paradoxical decrease in myf-5 messenger RNA levels during induction of myogenic differentiation by insulin-like growth factors. *Molec. Endocrinol.* 6: 2038–2044.
88. MARTIN, R.; WHITE, J. 1979. Muscle and adipose cell development in mice selected for postweaning growth rate. *Growth.* 43: 167-173.
89. MATEESCU, R. G.; THONNEY, M. L. 2005. Effect of testosterone on insulin-like growth factor-I, androgen receptor, and myostatin gene expression in splenius and semitendinosus muscles in sheep. *J. Anim. Sci.* 83:803–809.
90. MERSMANN, H. J. 1991. Regulation of adipose tissue metabolism and accretion in mammals raised for meat production. *In:* Pearson, C.A.M.; Dutson, T.R. eds. *Growth regulation in farm animals; advances in meat research.* London, Elsevier Applied Science. pp. 135–168.
91. _____; CAREY, G. B.; O'BRIAN SMITH E. 1997. Influence of nutritional weaning on porcine adipocyte β -adrenergic and adenosine A1 receptors. *J. Anim. Sci.* 75: 2368–2377.
92. MEYER, H. H. D.; RAPP, M. 1985. Estrogen receptors in skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* 60:294–300.
93. MILLER, W. H., JR.; FAUST, I. M.; HIRSCH, J. 1984. Demonstration of de novo production of adipocytes in adult rats by biochemical and radioautographic techniques. *J. Lipid Res.* 25:336-347.

94. MIRZAEI H. R, VERBYLA A. P, DELAND M. P, PITCHFORD W. S. 2009. Describing variation in carcass quality traits of crossbred cattle. *Pak J Biol Sci.*12(3): 222-30.
95. MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. 2002. IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGFdependent and -independent mechanisms. *J. Endocrinol.* 175: 19–31.
96. MUHLHAUSLER, B. S.; DUFFIELD, J. A.; MCMILLEN, I. C. 2007. Increased maternal nutrition stimulates peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR γ), adiponectin and leptin mrna expression in adipose tissue before birth. *Endocrinology.* 148: 878-885.
97. NORTON, S. A.; ZAVY, M. T.; MAXWELL, C. V.; BUCHANAN, D. S.; BREAZILE, J. E. 1989. Insulin, growth hormone, glucose, and fatty acids in gilts selected for rapid vs. slow growth rate. *Am. J. Physiol.* 257: E554–E560.
98. OHSAKI, H.; SAWA, T.; SASAZAKI, S.; KANO, K.; TANIGUCHI, M.; MUKAI, F.; MANNEN, H. 2007. Stearoyl-CoA desaturase mRNA expression during bovine adipocyte differentiation in primary culture derived from Japanese Black and Holstein cattle. *Comp. Biogen. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 148(3): 629-634.
99. OSTERC, J. 1974. Diameter and number of muscle fibers in musculus longissimus dorsi in connection with production properties of some cattle breeds. Tesis PhD. Ljubljana, Eslovenia. University Ljubljana. pp. 1-67.
100. OTTO, T. C.; ZAGOZEN, F. 1977. Eine Untersuchung des Einflusses der Rasse und der Ernährung auf die Zahl und den Durchmesser der Muskelfasern bei Rindern. *In: Annual Meeting EAAP (28th, 1977, Brussels, Belgium). Trabajos presentados. Proceedings. Brussels, s.e. pp. 1–6.*
101. _____.; LANE, M. D. 2005. Adipose development; from stem cell to adipocyte. *Cri. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 40:229–242.
102. PAMPUSCH, M. S.; KAMANGA-SOLLO, E.; WHITE, M. E.; HATHAWAY, M. R.; DAYTON, W. R. 2003a. Effect of recombinant porcine IGF-binding protein-3 on proliferation of embryonic porcine myogenic cell cultures in the presence and absence of IGF-I. *J. Endocrinol.* 176: 227–235.

103. _____.; JOHNSON, B. J.; WHITE, M. E.; HATHAWAY, M. R.; DUNN, J. D.; WAYLAN, A. T.; DAYTON, W. R. 2003b. Time course of changes in growth factor mRNA levels in muscle of steroidimplanted and nonimplanted steers. *J. Anim. Sci.* 81:2733–2740.
104. PAPSTEIN, H. J.; LOSAND, B.; GABEL, M.; FIEDLER, I.; ENDER, K. 1999.
Growth studies of bulls and heifers of twin births with high levels of nutrition. Communication pattern of growth, meat quality and muscle structure. *Breed. Sci.* 71: 267- 276.
105. [PENG, M.](#); [PELLETIER, G.](#); [PALIN, M. F.](#); [VÉRONNEAU, S.](#); [LEBEL, D.](#); [ABRIBAT, T.](#) Ontogeny of IGFs and IGFBPs mRNA levels and tissue concentrations in liver, kidney and skeletal muscle of pig. 1996. [Growth Dev. Aging.](#) Autumn-Winter. 60(3-4): 171-87.
106. PENNEY, R. K.; PRENTIS, P. F.; MARSHALL, P. A.; GOLDSPINK, G. 1983. Differentiation of muscle and the determination of ultimate muscle size. *Cell Tissue Res.* 228: 375-388.
107. PETHICK, D. W.; HARPER, G. S.; ODDY, V. H. 2004. Growth, development and nutritional manipulation of marbling in cattle; a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 44:705–715.
108. _____.; BARENDSE, W.; HOCQUETTE, J. F.; THOMPSON, J. M.; WANG, Y. H. 2007. Regulation of marbling and body composition; Growth and development, gene markers and nutritional biochemistry. *Ener. Prot. Metab.* 124: 75–88.
109. PORDOMINGO, A. J.; GRIGIONI, G.; CARDUZA, F.; GARCÍA, T.P.; PORDOMINGO A. B.; PINI, F.; MASGORET, S. 2009. Efectos del cruzamiento con Bonsmara sobre novillos en confinamiento; 2. parámetros de físicos y sensoriales de carne. Póster. (en línea). s.l., INTA. Consultado 15 nov. 2010.
Disponibile en
<http://www.inta.gov.ar/anguil/images/posters/produccionanimal/aapa2009/poster26.pdf>
110. PRINS, J. B.; O’RAHILLY, S. 1997. Regulation of adipose cell number in man. *Clin. Sci.* 92:3–11.

111. QUINTANS, G.; BANCHERO, G.; CARRIQUIRY, M.; LOPEZ-MAZZ, C.; BALDI, F. 2010. Effect of body condition and suckling restriction with and without presence of the calf on cow and calf performance. *Anim. Prod. Sci.* 50: 931–938.
112. REHFELDT, C.; FIEDLER, I. 1984. Postnatale Entwicklung der Muskelfasern im wachsenden Skelettmuskel der Labormaus. *Arch. Exp. Vet. Med.* 38: 178-192.
113. _____.; ANER, K.; BÜNGER, L. 1991. Cellular response of mouse skeletal muscle to nutritional restriction in laboratory mice. *Archiv für Tierzucht.* 34: 429–439.
114. _____.; WEIKARD, R.; REICHEL, K. 1994. Effects of the β adrenergic agonist clenbuterol on skeletal muscle growth in rats. *Arch. Anim. Nutr.* 45: 333-344.
115. _____.; STICKLAND, N. C.; FIEDLER, I.; WEGNER, J. 1999. Environmental and genetic factors as sources of variation in skeletal muscle fibre number. *B. App. Myology.* 9: 237–255.
116. _____.; FIEDLER, I.; DIETL, G.; ENDER, K. 2000. Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. *Live. Prod. Sci.* 66(2): 177–188.
117. RENAVILLE, B.; GLENN, K. L.; MOTE, B. E.; FAN, B.; STALDER, K. J.; ROTHSCILD, M. F. 2010. SREBP pathway genes as candidate markers in country ham production. *Ital. J. Anim. Sci.* 9: 7.
118. RENAVILLE, R.; HAMMADI, M.; PORTETELLE, D. 2002. Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. *Dom. Anim. Endocrinol.* 23: 351-360.
119. RISTOW, M.; MULLER-WIELAND, D.; PFEIFFER, A.; KRONE, W.; KAHN, C. R. 1998. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N. Engl. J. Med.* 339(14): 953–959.
120. ROSEN, E. D.; HSU, C. H.; WANG, X.; SAKAI, S.; FREEMAN, M. W.; GONZALEZ, F. J.; SPIEGELMAN, B. M. 2002. C/EBP β induces adipogenesis through PPAR γ ; a unified pathway. *Genes Dev.* 16: 22-26.
121. _____.; MACDOUGALD, O. A. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 885-896.

122. RUSSELL, R. G.; OTERUELO, F. T. 1981. An ultrastructural study of the differentiation of skeletal muscle in the bovine fetus. *Anat. Embryol. (Berl)* 162: 403-417.
123. SADKOWSKY, T.; JANK, M.; ZWIERZCHOWSKI, L.; OPRZADEK, J.; MOTY, T. 2009. Comparison of skeletal muscle transcriptional profile in dairy and beef bulls. *J. Appl. Genet.* 50(2): 109-123.
124. SARAIVIA, C.; CRUZ, G. 2003. Influencia del ambiente atmosférico en la adaptación y producción animal. Facultad de Agronomía (Montevideo). Nota Técnica no. 50. 36 p.
125. SCHADEREIT, R.; KLEIN, M.; REHFELDT, C.; KREIENBRING, F.; KRAWIELITZKI, K. 1995. Influence of nutrient restriction and realimentation on protein and energy metabolism, organ weights, and muscle structure in growing rats. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 74: 253–268.
126. SCHNEIDER, A.; MACHADO PFEIFER, L. F.; TEIXEIRA HAX L.; PALUDO, G. R.; BURKERT DEL PINO, F. A.; LAURINO DIONELLO, N. J.; NUNES CORRÊA, M. 2010. Insulin-like growth factor and growth hormone receptor in postpartum lactating beef cows. *Pesq. Agropec. Bras.* 45(8): s.p.
127. SHIMANO, H. 2002. Sterol regulatory element-binding protein family as global regulators of lipid synthetic genes in energy metabolism. *Progr. Lipid Res.* 40(6): 439-452.
128. SILHA, J.V.; GUI, Y.; MURPHY, L. J. 2002. Impaired glucose homeostasis in insulin-like growth factor-binding protein-3-transgenic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283: 937–945.
129. SIMEONE, A.; BERETTA, V. 1997. Evaluación del resultado económico de la aplicación del destete precoz. *Cangüé.* no. 10: 3-6.
130. SINHA-HIKIM, I.; ARTAZA, J.; WOODHOUSE, L.; GONZALEZ-CADAVID, N.; SINGH, A. B.; LEE, M. I.; STORER, T. W.; CASABURI, R.; SHEN, R.; BHASIN, S. 2002. Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283: 154–164.

131. _____.; ROTH, S. M.; LEE, M. I.; BHASIN, S. 2003. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285: 197–205.
132. _____.; TAYLOR, W. E.; GONZALEZ-CADAVID, N. F.; ZHENG, W.; BHASIN, S. 2004. Androgen receptor in human skeletal muscle and cultured muscle satellite cells; up-regulation by androgen treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89:5245–5255.
133. SJOÖGREN, K.; LIU, J. L.; BLAD, K. 1999 Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 7088–7092.
134. SMAS, C. M.; SUL, H. S. 1995. Control of adipocyte differentiation. *Biochem. J.* 309: 697–710.
135. SOCA, P.; PEREIRA, G. 2000. Aspectos relevantes de la cría vacuna en Uruguay. (en línea). In: Foro Organización de la Cría Vacuna (1999, Tacuarembó). Trabajos presentados. Montevideo, Instituto del Plan Agropecuario. s.p. Consultado 23 oct. 2010. Disponible en http://www.rau.edu.uy/agro/ccss_publicaciones.
136. SOLOMON, M. B.; CAMPBELL, R. G.; STEELE, N. C. 1990. Characteristics of growing pigs. Effect of sex and exogenous porcine somatotropin on longissimus muscle fiber. *J. Anim. Sci.* 68: 1176-1181.
137. SPENCER, G. S. G. 1985. Hormonal systems regulating growth. A review. *Livest. Product. Sci.* 12: 31–46.
138. _____.; ROBINSON, G. M. 1993. Stimulation of placental, fetal and neonatal growth by thyroxine administration to pregnant rats. *J. Endocrinol.* 139: 275-279.
139. _____.; SCHUMANN, A.; BERRY, C.; WOLFF, J. E.; NAPIER, J. R.; HODGKINSON, S. C.; BASS, J. J. 1994. Comparison of the effects of recombinant ovine, bovine and porcine growth hormones on growth, efficiency and carcass characteristics in lambs. *Livest. Product. Sci.* 37: 311–321.
140. SPIEGELMAN, B. M. 1998. PPAR-gamma; adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes.* 47: 507–514.

141. STANNARD, S. R.; JOHNSON, N. A. 2004. Insulin resistance and elevated triglyceride in muscle: More important for survival than "Thrifty" genes. *J. Physiol.* 554: 595-607.
142. STAUN, H. 1972. The nutritional and genetic influence on number and size of muscle fibres and their response to carcass quality in pigs. *W. Rev. Anim. Product.* 3: 18-26.
143. STICKLAND, N.C.; GOLDSPINK, G. 1975. A note on porcine skeletal muscle parameters and their possible use in early progeny testing. *Anim. Product.* 21: 93-97.
144. _____.; HANDEL, S. E. 1986. The numbers and types of muscle fibres in large and small breeds of pigs. *J. Anat.* 147: 181-189.
145. STUMVOLL, M.; HARING, H. 2002. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes.* 51: 2341-2347.
146. SVANBERG, E.; OHLSSON, C.; KIMBALL, S. R.; LUNDHOLM, K. 2000. rhIGF-I/IGFBP-3 complex, but not free rhIGF-I, supports muscle protein biosynthesis in rats during semistarvation. *Europ. J. Clin. Invest.* 30: 438-446.
147. SWATLAND, H. J. 1975. Myofibre number and myofibrillar development in neonatal pig. *Zbl. Vet-Med.* 22: 756-764.
148. TANAKA, N.; HAYAKAWA, T.; ZYO, K.; HORI, S. 1992. The morphological and biochemical changes in skeletal muscle fibers by dietary protein restriction. *J. Nutr. Sci. Vitam.* 38: 523-528.
149. TANIGUCHI, M.; GUAN, L. L.; ZHANG, B.; DODSON, M. V.; OKINE, E.; MOORE, S. S. 2008. Adipogenesis of bovine perimuscular preadipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366(1): 54-59.
150. TE PAS, M. F. W.; EVERTS, M. E.; HAAGSMAN, H. P. 2004. Muscle development of livestock animals; physiology, genetics, and meat quality. s.l., CAB International. 411 p.
151. TIONG, T. S.; HERINGTON, A. C. 1991. Tissue distribution, characterization, and regulation of messenger ribonucleic acid for growth

- hormone receptor and serum binding protein in the rat. *Endocrinology*. 129: 1628–1634.
152. _____.; _____. 1992. Ontogeny of messenger RNA for the rat growth hormone receptor and serum binding protein. *Molec. Cell. Endocrinol.* 83: 133–141.
153. TONG, J.; ZHU, M. J.; UNDERWOOD, K. R.; HESS, B. W.; FORD, S. P.; DU M. 2008. AMP-activated protein kinase and adipogenesis in sheep fetal skeletal muscle and 3T3-L1 cells. *J. Anim. Sci.* 86: 1296-1305.
154. _____.; YAN, X.; ZHU, M. J.; FORD, S. P.; NATHANIELSZ, P. W.; DU M. 2009. Maternal obesity downregulates myogenesis and β -catenin signaling in fetal skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296: E917-924.
155. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERIA AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCION DE INVESTIGACION DE ESTADISTICA AGROPECUARIA. 2009. Anuario Estadístico 2008. (en línea). Montevideo. Consultado 18 nov. 2010. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/Dica/>
156. VALET, P.; TAVERNIER, G.; CASTAN-LAUREL, I.; SAULNIER-BLACHE, J. S.; LANGIN, D. 2002. Understanding adipose tissue development from transgenic animal models. *J. Lipid Res.* 43: 835-860.
157. VAN DER LEE, K. A.; VORK, M. M.; DE VRIES, J. E.; WILLEMSSEN, P. H.; GLATZ, J. F.; RENEMAN, R. S.; VAN DER VUSSE, G. J.; VAN BILSEN, M. 2000. Long chain fatty acid-induced changes in gene expression in neonatal cardiac myocytes. *J. Lipid Res.* 41: 41–47.
158. WANG, Y. H.; BYRNE, K. A.; REVERTER, A.; HARPER, G. S.; TANIGUCHI, M.; MCWILLIAM, S. M.; MANNEN, H.; OYAMA, K.; LEHNERT, S. A. 2005. Transcriptional profiling of skeletal muscle tissue from two breeds of cattle. *Mamm. Genome.* 16: 201–210.
159. _____.; BOWER, N. I.; REVERTER, A.; TAN, S. H.; DE JAGER, N.; WANG, R.; MCWILLIAM, S. M.; CAFE, L. M.; GREENWOOD, P. L.; LEHNERT S. A. 2009. Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. *J. Anim Sci.* 87: 119-130.

160. WHITE, T. P.; ESSER, K. 1989. Satellite cell and growth factor involvement in skeletal muscle growth. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 21: 158-163.
161. WHITE, M. E.; JOHNSON, B. J.; HATHAWAY, M. R.; DAYTON, W. R. 2003 Growth factor messenger RNA levels in muscle and liver of steroid-implanted and nonimplanted steers. *J. Anim. Sci.* 81: 965–972.
162. WOODALL, S. M.; BREIER, B. H.; JOHNSTON, B. M.; GLUCKMAN, P. D. 1997. Reduced maternal nutrition during gestation in the rat leads to temporary growth hormone resistance during the neonatal period. *In: Annual Meeting of The Endocrine Society (79th, 1997, Minneapolis, U.S.A.). Proceedings. Minneapolis, s.e. pp. 1–123.*
163. WU, Z.; ROSEN, E. D.; BRUN, R.; HAUSER, S.; ADELMANT, G.; TROY, A. E.; MCKEON, C.; DARLINGTON, G. J.; SPIEGELMAN, B. M. 1999. Cross-regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell.* 3: 151-158.
164. XI, G.; KAMANGA-SOLLO, E.; PAMPUSCH, M. S.; WHITE, M. E.; HATHAWAY, M.R.; DAYTON, W. R. 2004. Effect of recombinant porcine IGFBP-3 on IGF-I and long-R3-IGF-I-stimulated proliferation and differentiation of L6 myogenic cells. *J. Cell. Physiol.* 200: 387–394.
165. YAKAR, S.; LIU, J. L.; STANNARD, B.; BUTLER, A.; ACCILI, D.; SAUER, B.; LEROITH, D. 1999. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 7324–7329.
166. YAMADA, T.; KAWAKAMI, S. I.; NAKANISHI, N. 2007. Effects of fattening periods on the expression of adipogenic transcription factors in Wagyu beef cattle. *Meat Sci.* 76(2): 289-294.
167. YEN, C. J.; BEAMER, B. A.; NEGRI, C.; SILVER, K.; BROWN, K. A.; YARNALL, D. P.; BURNS, D. K.; ROTH, J.; SHULDINER, A. R. 1997. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor-c (PPAR) gene in diabetic Caucasians; identification of a Pro12Ala PPARc2 missense mutation. *Biophys. Res. Commun.* 241: 270–274

168. ZAMBRANO, E.; MARTINEZ-SAMAYOA, P. M.; BAUTISTA, C. J.; DEAS, M.; GUILLEN, L.; RODRIGUEZ-GONZALEZ, G. L.; GUZMAN, C.; LARREA, F.; NATHANIELSZ, P. W. 2005. Sex differences intransgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J. Physiol.* 566: 225-236.
169. ZHU, M. J.; FORD, S. P.; MEANS, W. J.; HESS, B. W.; NATHANIELSZ, P. W.; DU, M. 2006. Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *J. Physiol.* 575: 241-250.

10. ANEXOS

10.1. PROTOCOLO PARA BIOPSIAS DE TEJIDO MUSCULAR EN BOVINOS

Objetivo: Describir el procedimiento de obtención y procesamiento de las muestras de tejido muscular, las cuales serán usadas para posteriores análisis tanto histológicos (determinación de número y diámetro de fibras musculares, y número de núcleos en cada una de ellas mediante observación con microscopio óptico) como genéticos (determinación de la concentración ARNm para los receptores de GH, IGF-1 y proteínas ligadoras BP3)

Seguridad: El personal tomará las prevenciones del caso en relación al animal y a la toma de muestras para evitar accidentes a la hora de manejar los mismos. Se utilizarán técnicas asépticas y el material a emplearse deberá ser estéril (se mantendrá en una bandeja de acero inoxidable con clorexidina) para asegurar de esta manera tanto la buena calidad de las muestras obtenidas como la seguridad y el bienestar del animal. Deberá en este punto contemplarse la correcta sujeción del animal y el uso de guantes por parte del operador.

Materiales y métodos

Preparación del animal

Materiales:

- Desinfectante
- Recipiente con agua
- Alcohol 70%
- Yodopovidona
- Torundas
- Tijera
- Jeringas descartables de 10mL y agujas 18G
- Afeitadora
- Lidocaína al 2%

Técnica:

- Sujeción apropiada del animal a intervenir
- Lavado de la zona a incidir (región posterior del miembro trasero izquierdo sobre el músculo Semitendinoso, a 6 cm. distal de la tuberosidad isquiática y a 1,5 cm. de los bordes del músculo) con detergente y enjuagar
- Recorte del pelo y depilación del área de incisión con afeitadora
- Desinfección del área con alcohol 70 y yodo mediante torundas
- Inyección de 4mL de Lidocaína al 2% percutánea en abanico y en profundidad en la zona a incidir, esperar aproximadamente 5 minutos para que el anestésico haga efecto

Obtención de la Muestra:

Materiales:

- Mango de bisturí No. 3 o 4 Y hojas intercambiables rectas

- Pinza (dientes de ratón)
- Gotita autoadhesiva
- Alcohol 70% e Yodopovidona
- Torundas
- Antimiásico en spray (Baterplata o similar)

Técnica:

- Realizar una incisión de unos 4cm con bisturí en la zona posterior del músculo semitendinoso a 6 cm. de la tuberosidad isquiática a 1,5 cm. de los bordes del músculo
 - Al visualizar el tejido muscular tomar una porción de unos 2 x 1 x 1cm, de largo, ancho y profundidad respectivamente, con una pinza dientes de ratón e incidir con bisturí obteniendo una fracción rectangular del músculo con un peso aproximado de 2gr.
- Se limpia la zona con torunda, tratando de retirar toda la sangre de la herida,
- Se procede a cerrar la herida con la aplicación de gotita autoadhesiva y se desinfecta con yodóforo (mediante torundas) y luego se aplica un antimiásico cicatrizante (baterplata o similar) en spray a no menos de 15cm de la herida y de manera que cubra toda la zona
- Finalmente se libera al animal, vigilando que la herida no se abriera al momento de incorporarse el ternero.

Procesamiento de la muestra:

Materiales:

- Recipientes plásticos para el lavado de las muestras
- Suero fisiológico
- Tubos rotulados para histología
- Formaldehído
- Tubos eppendorf identificados para congelar inmediatamente en nitrógeno líquido
- Tanque de frío

Técnica:

Una vez obtenida la muestra se lavará en un recipiente con suero fisiológico, se escurrirá en el borde del mismo y se destinará una porción de ésta (1x1cm aprox) para el estudio histológico, para el cual se deberá tener la precaución que el trozo a emplearse no haya sido alterado por el uso de las pinzas y se lo colocará en un tubo de 5mL con formol buffer al 4%. Otra porción de la muestra se colocará en un tubo eppendorf para su conservación en nitrógeno líquido y posterior análisis.

Las muestras deberán colocarse en tubos debidamente identificados donde se especifique el No. de caravana del animal, tipo de muestra y fecha de obtención de la misma

10.2. EXTRACCIÓN DE RNA – TRATAMIENTO CON DNasa

NOTA: Trabaje bajo campana cuando se esta explicito, use túnica y guantes. Use material autoclavado o libre de mRNAsas y cambie guantes frecuentemente para evitar contaminación de las muestras durante el proceso. El líquido orgánico de deshecho debe colectarse en bidones especiales bajo campana.

- 1) Agregue 1 ml de **Trizol** a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- 2) Tare la balanza con el tubo eppendorf.
- 3) Homogenice en el **mortero** un trozo de tejido (hígado, tejido adiposo, glándula adrenal) agregando de a poco nitrógeno líquido para mantenerlo congelado o u utilice el homogeneizador, rompiendo el tejido con TRIZOL.

En caso de utilizar el homogeneizador, límpielo entre muestras utilizando: Agua limpia 1 min a baja velocidad, repítalo 2 veces (cambie el agua), Etanol absoluto 25 segundos a maxima velocidad, repítalo 2 veces (cambie el etanol) y Agua autoclavada 30 segundos máxima velocidad, repítalo 2 veces (cambie el agua). Seque el homogeneizador con Kleenex.

- 4) Pese en la **balanza** el tejido pulverizado, peso recomendado de **50 a 150 mg**. El volumen de la muestra no debe exceder el 10-15 % del volumen del TRIZOL.
- 5) **Vortee** la muestra **15 segundos** con el Trizol, no permita que la muestra levante temperatura por homogenización excesiva.
- 6) **Incube** a temp ambiente **5 minutos**.

(OPCIONAL) En casos de muestras con alto contenido de proteína o grasa luego de la homogenización, remueva el material insoluble por centrifugación a 120000 g por 10 minutos a 4 °C. El pellet resultante contiene membranas extracelulares, polisacaridos o DNA de alto PM. La grasa se concentra en la capa superior que debe removerse. Transfiera el homogenizado a un tubo limpio y continúe con el paso 4.

- 7) Agregue **200 ul de cloroformo** bajo campana.
- 8) **Vortee** a maxima velocidad por **15 segundos**.
- 9) **Incube** a temperatura ambiente por **2 a 3 minutos**.
- 10) **Centrifuge por 15 minutos a 4 °C (13.000 g)**. Luego del centrifugado, la mezcla se separa en una fase inferior roja, una interfase blanca y una fase acuosa superior sin color (esta contiene el RNA).

- 11) **Transfiera la fase superior acuosa a un tubo eppendorf** y agregue unos **600 ul** de la mezcla **fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1)**. Utilice fenol de pH bajo para purificación de RNA.
- 12) **Vortee** a alta velocidad y mezcla por 10 segundos pero no permita que se caliente la muestra.
- 13) **Incube** a temperatura ambiente por **15 minutos**.
- 14) **Centrifuge por 15 minutos** a 4 °C (130000 g).
- 15) **Transfiera la parte acuosa** a otro tubo eppendorf y agregue **500 ul de alcohol isopropílico**.
- 16) **Mezcle** invirtiendo el tubo gentilmente unas 4 a 6 veces.
- 17) **Incube** a temperatura ambiente **10 minutos**.
- 18) **Centrifuge por 15 minutos** a 4 °C (130000 g). Luego de la centrifugación, el precipitado que contiene el RNA es como un gel en el fondo del tubo.
- 19) **Decante el sobrenadante cuidando no se caiga el pellet**.
- 20) **Lave el RNA (pellet) con 1 ml de etanol al 75 %**, aspire y evacue el líquido con la micropipeta intentando romper el pellet. **Vortee. Trabaje de ahora en más a 4 °C (hielo)**.
- 21) **Centrifuge por 2 a 5 minutos** a 4 °C (13000 g).
- 22) **Decante el sobrenadante cuidando no se caiga el pellet. Deje secar el pellet unos 10 a 30 minutos**.
- 23) **Disuelva con H₂O DEPC** (60 ul por 100 mg de tejido) pipetando varias veces para romper el pellet. Lea la concentración en el espectrofotómetro nanodrop.

➤ **PRECIPITACION CON LiCl**

- 24) Agregue 60 ul de Cloruro de Litio e incube toda la noche a -20 C.
- 25) Centrifuge por 20 minutos a 4 C (13000g). El pellet de RNA debe ser transparente o levemente blanco.
- 26) Decante el sobrenadante con pipeta (solución es espesa)
- 27) Lave el RNA (pellet) con 1 ml de etanol al 75 %, aspire y evacue el líquido con la micropipeta intentando romper el pellet. Vortee por lo menos 30 segundos.
- 28) Centrifuge por 5 minutos a 4 C (13000 g).
- 29) Decante el sobrenadante cuidando no se caiga el pellet. Deje secar el pellet unos 10 minutos.
- 30) Disuelva con H₂O DEPC teniendo en cuenta la lectura en el Nanodrop anterior y una eficiencia de 80 %. pipetando varias veces para romper el pellet. Aliculote la muestra en 2 eppendorf de 0.5 mL IDENTIFICADOS y almacénelo a -80 C.
- 31) Lea la concentración final en el **espectrofotómetro Nanodrop**.
- 32) Verifique la **calidad del RNA** en una **corrida electroforética**, chequeando la condición de 18 y 28S usando un gel de agarosa 1% (3 a 4 ug de RNA).

➤ **TRATAMIENTO CON DNAase usando Ambion DNA-Free Kit**

- 1) Pipetear **10 µg del RNA total** (luego del LiCl) en un eppendorf de 0.2/0.5 ml
- 2) Adicionar 3 µl (1/10 volumen) de 10X **DNase buffer** y 1 µl de **DNase** (2U/µl) al tubo y llevar el volumen final a 30 µl usando **DEPC- H₂O**

NOTA: Si se tiene más de 1 reacción, usar mezcla master para reducir la variación del pipeteado

- 3) Mezclar bien con la pipeta.
- 4) Incubar a **37°C** por **30 minutos**.
- 5) Adicionar 3.0 - 3.5 µl de **DNase Inactivation Reagent** al tubo.
- 6) **Incubar** a temperatura ambiente por **2 minutos** e invertir los tubos varias veces durante la incubación
- 7) **Centrifugar** (13,000 g) por 1 minuto.
- 8) **Remover el sobrenadante** y pasarlo a un tubo nuevo IDENTIFICADO. Tener cuidado de no contaminar el sobrenadante con el pellet que contiene el reactivo de inactivación.
- 9) Chequear concentración del RNA usando el espectrofotómetro **NanoDrop** y calidad de RNA por **electroforesis**.
- 10) **Almacenar a -80 C**

10.3. CUADRADOS MEDIOS MÍNIMOS Y ERROR ESTÁNDAR PARA EL PESO A LOS 205 DIAS PARA LAS DISTINTAS RAZAS DE TOROS PARA CADA UNA DE LAS SUBCLASES DE FORRAJE PREVIAS AL DESTETE

	Raza					
Forraje	Bonsmara	Brangus	Charolais	Gelbvieh	Hereford	Romosinuano
Mejorado	227±6b	223 ± 5b	246 ± 6a	242 ± 6a	230 ± 7b	222 ± 7b
Nativo	244±5a	234 ± 4bc	249 ± 7a	240 ± 6ab	237 ± 6abc	226 ± 6c
Promedio	236 ± 4b	228 ± 3cd	247 ± 5a	241 ± 4ab	234 ± 5bc	224 ± 5d

a-d Medias en la misma fila con diferentes subscripts difieren ($P < 0.05$, excepto Gelbvieh vs Hereford $P \leq 0.12$; Bonsmara vs. Brangus, native, $P < 0.10$; Gelbvieh vs. Romosinuano, native, $P < 0.10$; y excepto Bonsmara vs. Brangus, promedio y Hereford vs. Romosinuano, promedio, $P < 0.11$).

10.4. REGRESIÓN DE LA GANANCIA DE LOS TERNEROS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LECHE MATERNA EN HIJOS DE 6 DIFERENTES RAZAS DE TOROS (ADAPTADO DE WANG ET AL., 2009).

