

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**IMPACTO DE LA NUTRICIÓN MATERNA DURANTE LA GESTACIÓN SOBRE
LAS CARACTERÍSTICAS DEL TEJIDO MUSCULAR EN TERNEROS HIJOS DE
VACAS PURAS Y CRUZAS**

Por

MACHADO LÓPEZ, Paula

MUZZIO AROTCE, Ana Carolina

TESIS DE GRADO presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias Orientación: Medicina e
Higiene, Inspección- Control y Tecnología de los
Alimentos de Origen Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO

URUGUAY

2013

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa:



Dra. Raquel Pérez

Segundo miembro (Tutor):



Ing. Agr. Mariana Carriquiry

Tercer miembro:

Dra. Cristina López

Cuarto miembro (Co-tutor):

Dr. Alejandro Bielli

Fecha: 21 de junio de 2013

Autores:

Br. Paula Machado López

Br. Ana Carolina Muzzio Arotce

A mi familia, en especial a mi padre quien con su ejemplo me impulsó a llegar a ser quien soy y nunca bajar los brazos. A mi madre y a Gladys por acompañarme y apoyarme en este camino con paciencia y contención, y a mi hermana que siempre me animó a seguir adelante.

A Renzo, siempre presente, que desde el inicio me acompañó en esta carrera, la de la vida, respetando mi formación y apoyándola de manera incondicional y con total entrega en pro de mi felicidad, hoy la nuestra.

A Quique, Silvana y Paula por ser mi segundo hogar, mi segunda familia en un momento en que todo era nuevo.

Carolina

A mi familia, por su apoyo incondicional, su ejemplo, su comprensión, su confianza. Por haberme convertido en quién soy y haber hecho posible esta oportunidad. A mi padre por ser motor y fuerza, y a mi madre compañera y escucha. A mi hermana por comprender descuidos...

A Bruno por ser comprensión, apoyo y refugio. Compañero de la vida que ha sabido respetar la importancia de este emprendimiento de manera incondicional, y hacer posible que hoy miremos un horizonte común.

Paula

A nuestros amigos, los de allá y los de acá, unos por saber entender las ausencias, y los otros por hacer de esta etapa todo lo que fue.

AGRADECIMIENTOS

- A la Ing. Agr. Mariana Carriquiry por habernos guiado y apoyado en la realización de este trabajo, contribuyendo a nuestra formación profesional y personal con su impulso y ejemplo.
- Al Dr. Alejandro Bielli, la Br. Patricia Genovesse y a los ayudantes de la cátedra que hicieron posible nuestro entrenamiento en el procesamiento de las muestras y la utilización de equipos necesarios para las determinaciones histológicas.
- A la Dra. Verónica Gutiérrez por el tiempo y el apoyo brindado, tanto en el entrenamiento para técnicas específicas como en el procesamiento de los datos, así como por sus valiosas horas invertidas en nosotros.
- A la Ing. Agr. Ana Laura Astessiano por su colaboración en el entrenamiento en técnicas de PCR en tiempo real.
- A la Dra. Ana Meikle y al personal del Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria por la buena disponibilidad con la que nos recibieron en su lugar de trabajo.
- Al personal funcionario y docente del Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria por la buena disponibilidad con la que nos recibieron y nos permitieron compartir su sitio de trabajo.
- Al personal de la estación Estación Experimental Bernardo Roseghurt (EEBR; Facultad de Agronomía, Bañados de Medina, Cerro Largo), por su apoyo permanente con las actividades allí realizadas.
- A todo el personal de la biblioteca de la Facultad de Veterinaria por habernos brindado un gran apoyo en la realización de la revisión bibliográfica.
- A nuestra casa de estudios, la Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, por habernos enriquecido como profesionales y personas, abriéndonos un nuevo horizonte.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	Página 2
AGRADECIMIENTOS.....	Página 4
LISTA DE TABLAS.....	Página 5
RESUMEN.....	Página 6
SUMMARY.....	Página 7
INTRODUCCIÓN.....	Página 8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	Página 10
DESARROLLO MUSCULAR Y SU REGULACIÓN.....	Página 10
EJE SOMATOTRÓPICO.....	Página 13
HORMONA DE CRECIMIENTO.....	Página 14
FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A LA INSULINA.....	Página 16
ADIPOGÉNESIS Y SU REGULACIÓN.....	Página 18
HIPÓTESIS.....	Página 22
OBJETIVOS.....	Página 22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	Página 23
DISEÑO EXPERIMENTAL, TRATAMIENTOS Y ANIMALES.....	Página 23
DETERMINACIONES HISTOLÓGICAS.....	Página 24
RT-PCR EN TIEMPO REAL.....	Página 24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	Página 25
RESULTADOS.....	Página 28
DISCUSIÓN.....	Página 30
PESO VIVO Y CARACTERÍSTICAS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LOS TERNEROS AL NACIMIENTO.....	Página 30
EXPRESIÓN GÉNICA DEL MÚSCULO SEMITENDINOSO.....	Página 31
CONCLUSIONES.....	Página 33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	Página 35

ANEXO 1: PROTOCOLO PARA BIOPSIA DE TEJIDO MUSCULAR EN BOVINOS.....	Página 44
ANEXO 2: PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE LAS MUESTRAS: PROTOCOLO.....	Página 46
ANEXO 3: PROTOCOLO COLORACIÓN: HEMATOXILINA-EOSINA.....	Página 48

LISTA DE TABLAS

TABLA 1.....	Página 28
TABLA 2	Página 29
TABLA 3	Página 30
TABLA 4.....	Página 31

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la nutrición y el genotipo materno durante la vida fetal sobre el PV así como las características y expresión génica del tejido muscular de los terneros al nacimiento. Cuarenta terneros cruza y sus madres (puras-PU: Hereford y Angus, y cruza-CR: F1) fueron asignados a un diseño de bloques al azar con un arreglo factorial de disponibilidad de forraje de campo natural (Alta: AO; Baja: BO, 4 vs. 2.5 kg materia seca/kg PV) y genotipo materno (PU vs. CR). Se colectaron muestras de músculo *Semitendinoso* al momento del nacimiento y se midió la expresión génica en el mismo mediante SYBR-Green PCR en tiempo real usando ACTB y HPRT como controles endógenos. Los datos fueron analizados utilizando el procedimiento MIXED incluyendo la oferta de forraje, el genotipo materno y su interacción, y el sexo del ternero como efectos fijos y los bloques como efecto aleatorio. El PV de los terneros al nacimiento (39.8 ± 2.6 kg) y el diámetro de las fibras del músculo *Semitendinoso* (43.7 ± 1.7 μm) no difirieron debido a la oferta de forraje ni al genotipo materno, sin embargo la densidad de fibras fue menor ($P < 0.05$) en los hijos de vacas en BO-CR respecto a los otros grupos de terneros (5.5×10^{-4} , 5.7×10^{-4} , 6.0×10^{-4} y $4.2 \times 10^{-4} \pm 0.7 \times 10^{-4}$ fibras/ μm^2 para AO-PU, BO-PU, AO-CR, BO-CR, respectivamente). La abundancia de ARNm de *IGF1* en el músculo fue mayor ($P \leq 0.04$) en los hijos de vacas en AO que en los de BO (1.20 vs. 0.66 ± 0.06), mientras que la expresión de ARNm de *GHR* tendió ($P < 0.09$) a serlo (3.01 vs 1.05 ± 0.76). La expresión de ARNm de *IGFR1*, *IGFBP3* e *IGFBP5* tendió ($P < 0.09$) a ser mayor en los hijos de vacas CR respecto a los hijos de vacas PU (1.0 vs 0.52 ± 0.20 , 0.98 vs. 0.64 ± 0.19 , 1.0 vs. 0.66 ± 0.12 , respectivamente). La expresión de ARNm de *PPAR γ* fue mayor ($P = 0.02$) en los hijos de vacas en AO respecto a aquellos de vacas en BO (0.54 vs. 0.34 ± 0.08) pero la abundancia de ARNm de *SREBF1* no difirió entre los terneros de los distintos tratamientos. La mayor disponibilidad de forraje ofrecida a las vacas durante la gestación incrementó la expresión de ARNm de *IGF1* y *PPAR γ* en el músculo de los terneros al nacimiento, lo que podría incrementar el potencial de crecimiento de este tejido así como su capacidad adipogénica. Además, fueron los hijos de vacas CR los que mostraron una expresión aumentada de los componentes de sistema IGF en el músculo.

SUMMARY

The aim of this study was to determine the effect of nutrition and maternal genotype during fetal life on calf BW and muscle tissue's characteristics and gene expression in calves at birth. Forty crossbred calves and their dams (purebred-PU: Hereford and Angus, and crossbred-CR: F1) were used in a randomized block design with a factorial arrangement of herbage allowance of native pastures (High: Hi-HA and Low; Lo-HA, 4 vs. 2.5 kg dry matter/kg BW) and dam genotype (PU vs. CR). *Semitendinosus* muscle samples were collected at birth to measure gene expression by SYBR-Green real time PCR using *ACTB* and *HPRT* as endogenous controls. Data were analyzed using the MIXED Procedure including herbage allowance, dam genotype, their interaction and calf sex as fixed effects and blocks as a random effect. Calf BW at birth (39.8 ± 2.6 kg) and *Semitendinosus* muscle fiber diameter (43.7 ± 1.7 μm) did not differ due to herbage allowance nor to dam genotype but muscle fiber density was less ($P < 0.05$) in Lo-CR offspring than in other calf groups (5.5×10^{-4} , 5.7×10^{-4} , 6.0×10^{-4} and $4.2 \times 10^{-4} \pm 0.7 \times 10^{-4}$ fiber/ μm^2 for Hi-PU, Lo-PU, Hi-CR, Lo-CR, respectively). Muscle *IGF1* mRNA was greater ($P \leq 0.04$) in Hi-HA than Lo-HA offspring (1.20 vs. 0.66 ± 0.06), however the expression of *GHR* RNA tended to be greater ($P < 0.09$) in those animals (3.01 vs. 1.05 ± 0.76). Muscle expression of *IGFBP3*, *IGFBP5* and *IGF1R* mRNA tended ($P < 0.09$) to be greater in CR than PU offspring (1.0 vs. 0.52 ± 0.20 , 0.98 vs. 0.64 ± 0.19 , 1.0 vs. 0.66 ± 0.12 , respectively). Muscle expression of *PPAR γ* mRNA was greater ($P = 0.02$) in Hi-HA than Lo-HA offspring (0.54 vs. 0.34 ± 0.08) but *SREBF1* mRNA did not differ among calves. High herbage allowance of native pastures offered to beef dams during gestation would increase calf muscle *IGF1* and *PPAR γ* mRNA expression at birth, which could increase growth and muscle adipogenesis potential. In addition, CR offspring had an increased mRNA expression of IGF system components in muscle.

INTRODUCCIÓN

Uruguay se encuentra actualmente ocupando el séptimo lugar como exportador de carne bovina a nivel mundial, constituyendo este rubro el 22% de las exportaciones totales del país. (MGAP, 2011). El PBI total para el año 2010 fue de 40.263 millones de dólares, siendo el PBI para el sector agroindustrial el 11,87% del PBI total. Dentro del sector agroindustrial el PBI agropecuario comprendió el 68,92%. (INIA, 2012a)

La carne bovina comprende el 82% de la producción del sector cárnico nacional, (INIA, 2012a), contando en el año 2011 con un stock bovino de 11.101 miles de cabezas y con una faena para ese mismo año de 2.010.820 cabezas de ganado, obteniéndose por exportaciones 1.342.053.000 de dólares con predominio de la carne refrigerada (INIA, 2012b).

En cuanto a los principales mercados de exportación para nuestros productos cárnicos bovinos encontramos en primer lugar a los países de la unión europea representando el 25,76% del ingreso, le sigue la Federación Rusa con un 19,77%, luego el MERCOSUR con un 13,94% (siendo los principales compradores Chile y Brasil), seguidos por los países que conforman el NAFTA con un 13,64% de los ingresos (predominando la venta a EEUU con 71,48% de producto vendido) y por último Israel con un 11,66% del ingreso por exportación de carne bovina (período ene-oct 2012) (INIA, 2012b).

En Uruguay, el proceso de cría vacuna, primer eslabón de la cadena cárnica, se realiza casi completamente sobre campo natural, lo que ha permitido la certificación de la carne bovina uruguaya para destinos de venta con este tipo de exigencias como lo es EEUU. Esta cualidad fue reconocida desde el año 2004 por el departamento de agricultura de los Estados Unidos cumpliendo con los requisitos de animales trazados, ausencia de hormonas y/o antibióticos en su crianza, prohibición de alimentación de estos animales con proteínas de origen animal y crianza en un sistema predominantemente pastoril y sin confinamiento. Esto garantiza, dentro de un sistema productivo sustentable, la obtención de un producto natural, seguro, altamente nutritivo, extra-magro (con una mayor proporción de ácidos grasos poli insaturados) y con un sabor distintivo. (INIA, 2012c)

En los sistemas pastoriles de nuestro país el último tercio de la gestación de las vacas suele transcurrir durante los meses de invierno, lo que condiciona la disponibilidad y calidad de forraje en el campo natural (Berreta y col., 2000), coincidiendo este momento con los mayores requerimientos necesarios para el crecimiento fetal, determinando un período de balance energético negativo en el cual

las vacas movilizan reservas, perdiendo condición corporal, con el fin de poder cubrir los requerimientos de gestación (Soca y col., 2012).

La subnutrición materna durante la gestación puede alterar el crecimiento y desarrollo fetal debido al disminuido aporte de sustratos a través de la placenta (Funston y col., 2010), pudiendo repercutir en el peso al nacimiento del ternero. (Holland y Odde, 1992; Greenwood y Cofe, 2007). Asimismo, la nutrición materna durante la gestación puede “programar el desarrollo” del ternero y afectar su comportamiento productivo futuro. La programación fetal es la respuesta a desafíos específicos por parte del organismo del mamífero durante un momento crítico del desarrollo que altera la trayectoria del mismo cualitativa o cuantitativamente resultando en efectos persistentes (Nathanielsz y col., 2007). Es así que el ambiente intrauterino puede alterar la expresión genómica del feto y tener consecuencias de por vida conociéndosele a este fenómeno como programación fetal (Wu y col., 2006).

Esta teoría puede justificar el retardo en el crecimiento pos natal, la disminución en la eficiencia del aprovechamiento de nutrientes y la reducción en la calidad de carne (Wu y col., 2006).

La producción cárnica está basada en las características y desarrollo del músculo esquelético de los animales (Lefaucheur y Gerrard, 2000). Siendo el número de fibras musculares determinado por factores ambientales y genéticos que influyen en la miogénesis durante la vida intrauterina; mientras el crecimiento postnatal consiste fundamentalmente en aumento en longitud y diámetro de las fibras y su fusión con células satélites (Dayton y White, 2008).

El número de fibras musculares al nacimiento determinará la capacidad de crecimiento posnatal del músculo, condicionando la producción carnífera futura de los terneros (Dayton y White, 2008).

Durante el desarrollo intrauterino se forman además adipocitos intramusculares que serán sitios de acumulación de grasa durante el engorde de los animales. En rumiantes, la adipogénesis se inicia aproximadamente a mitad de la gestación, coincidiendo con el período de miogénesis secundaria, siendo la eficacia del manejo nutricional para promover la adipogénesis intramuscular, en sistemas pastoriles, mayor en las primeras etapas de desarrollo (etapa fetal y neonatal (Du y col., 2010). Es así que, las restricciones nutricionales de las madres en este período repercutirán sobre la cantidad (masa muscular) y calidad (marmoleado, palatabilidad, ternesa) de la carne producida (Du y col., 2010).

El control de la intensidad de pastoreo de campo nativo, a través del manejo de la oferta de forraje, modifica el balance energético de las vacas de cría durante la gestación y lactancia (DoCarmo sin publicar; Laporta, 2012) siendo una posible estrategia para mejorar el plano nutricional durante la etapa fetal y aumentar así el comportamiento productivo futuro del ternero. La generación de nuevos conocimientos que permitan incrementar la eficiencia global de utilización de campo nativo, obteniendo productos de alta calidad, parecería fundamental para nuestro país en el marco de la importancia económica y social que tiene la producción de carne sobre campo nativo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Desarrollo muscular y su regulación:

El crecimiento muscular se debe principalmente a dos procesos biológicos: la proliferación celular y el acúmulo de proteínas. El músculo se desarrolla a partir de la hoja mesodérmica del embrión y deben ocurrir dos cambios fundamentales para la constitución de este tejido. En primer lugar las células precursoras de músculo deben aumentar en número, para luego experimentar cambios en su síntesis proteica que les permitan sintetizar proteínas características de este tejido (Allen y col., 1979).

Las células mesenquimales pueden dar origen a fibras musculares, adipocitos o fibroblastos (Lefaucheur y Gerrard, 2000). Los mioblastos presuntivos son la última célula del linaje miogénico capaz de sintetizar ADN y dividirse. La fusión de estos mioblastos mononucleados lleva a la formación de células multinucleadas (miotúbulos), cuyos núcleos son incapaces de sintetizar ADN (Allen y col., 1979). Esto se demostró utilizando células de músculo de embrión de pollo las que en cultivo celular se diferenciaron en células multinucleadas similares a las del músculo maduro (Konigsberg, 1961).

Las fibras musculares son células elongadas multinucleadas es decir cada una es un sincitio que contiene varios núcleos en un citoplasma común (Duan y col., 2010) que se pueden clasificar según su contractilidad y propiedades metabólicas. La contractilidad está determinada por el polimorfismo de la cadena pesada de polimiosina, que constituye el componente principal de los filamentos finos y determina la velocidad de acortamiento. Desde el punto de vista metabólico las fibras se pueden clasificar en oxidativas y no oxidativas (o glucolíticas) radicando esta diferencia en la actividad de la enzima mitocondrial succinodeshidrogenasa (SDH) (Lafaucher y Gerrard, 2000).

Las fibras de contracción lenta o tipo 1 (oxidativas) son usadas para mantener la postura, mientras que las de contracción rápida o tipo 2 (glucolíticas) producen movimientos. Generalmente los músculos profundos involucrados en el mantenimiento de la postura contienen más fibras tipo 1 que aquellos superficiales involucrados en movimientos rápidos. El mayor porcentaje de fibras tipo 1 mejora la terneza y jugosidad en el músculo *longissimus* en el ganado (Lefaucheur y Gerrard, 2000). Las fibras musculares de tipo oxidativo tienen más fosfolípidos que las glucolíticas. Como los fosfolípidos son determinantes del sabor de la carne al cocinarla, el tipo de fibra muscular influye en su sabor (Lefaucheur y Gerrard, 2000). A su vez la calidad de la carne también está condicionada por la composición del músculo esquelético en cuanto a número de fibras, grasa y tejido conectivo (Wu y col., 2006).

En cerdos se ha demostrado que fetos de mayor tamaño dentro de la misma camada exhibieron un mayor número de fibras secundarias en el músculo *semitendinoso* que sus hermanos de menor tamaño. El diámetro de las fibras primarias de los fetos mayores de tamaño fue también mayor pudiendo estas dar un mejor soporte para el desarrollo de las fibras secundarias (Stickland y col., 2004). A su vez estos animales con mayor potencial de crecimiento tienen una mayor proporción de fibras rápidas glucolíticas que aquellos animales de menor potencial de crecimiento (Bernard y col., 2009).

Se ha propuesto que la irrigación que nutre al músculo no se desarrolla en la misma proporción/velocidad en que lo hace la masa muscular, sobre todo en animales de alta capacidad de crecimiento, por lo que el aporte de oxígeno que recibe el músculo queda condicionado al menor desarrollo de la red de capilares que lo nutre. Por esta razón, el tipo de fibras cambiaría a unas de contracción rápida glicolíticas (Bernard y col., 2009). El hecho de que las fibras musculares tendieran a ser del tipo glicolítico se asoció en este trabajo positivamente con la terneza de la carne pero redujo el sabor ya que el contenido de grasa intramuscular se vio disminuído (Bernard y col., 2009).

El peso muscular es función del número total de fibras, el área de sección transversal y el largo de las mismas. La capacidad de crecimiento del músculo está positivamente relacionada al número de fibras, característica que queda determinada antes del nacimiento (Lefaucher y Gerrard, 2000).

El aumento en el número total de fibras musculares sin aumentar el tamaño del músculo sería la estrategia más plausible para aumentar la productividad sin comprometer la calidad de la carne (Lefaucher y Gerrard, 2000). Es así que animales de rápido crecimiento que contienen alto número de fibras musculares con una pequeña área de corte en general tienen mejor calidad de carne (Wu y col., 2006). Animales con valores de peso vivo equivalente y alto número de fibras, tendrán menores diámetros de las mismas respecto a animales con menor número de fibras musculares (Dwyer y col., 1993; Gondret y col., 2006; Du y col., 2011).

La etapa fetal es crucial para el desarrollo del músculo esquelético ya que el número de fibras no aumenta luego del nacimiento (Du y col., 2010), esto sucede debido a que repercute sobre el número de mioblastos presuntivos en el embrión (Allen y col., 1979). Periodos de deficiencia nutricional durante la preñez repercutirán en la programación fetal del músculo esquelético, reduciendo el número de fibras musculares y alterando el marmoleado en la cría (Du y col., 2010).

En el feto bovino las fibras musculares primarias se forman en los 2 primeros meses de gestación (Russell y Oteruelo, 1981). Sin embargo es muy limitado el número de fibras que se forman en este periodo, por lo que la nutrición materna en este momento afecta muy poco el desarrollo del músculo esquelético. La mayoría de las fibras secundarias musculares se forman entre el segundo y séptimo u octavo mes de gestación en el ganado, coincidiendo con el momento de la adipogénesis (Russell y Ortuelo, 1981). La reducción en el número de fibras en este periodo tiene consecuencias negativas e irreversibles para la descendencia.

El músculo esquelético madura hacia el final de la gestación (día 105 en ovinos, día 210 en bovinos) por lo que la restricción de nutrientes no tiene mayor impacto en el

número de fibras musculares en este período. Por ejemplo en un trabajo realizado por Mc Coart y col., 2000, en el que evaluaron fetos a término de gestaciones gemelares, constataron que el disminuido aporte de nutrientes hacia el final de la gestación debido a su condición de mellizos provocó la disminución del diámetro de las fibras musculares sin afectar el número de estas.

En suinos se ha constatado que las fibras de primera generación se forman entre los días 35 y 55 de la gestación, mientras que las de segunda generación lo hacen entre el día 55 al 90 o 95. Considerándose establecido el número total de fibras a los 90 o 95 días de gestación en esta especie (Lefaucheur y Gerrard 2000).

El crecimiento pos natal del músculo se debe al aumento en tamaño de las fibras musculares (hipertrofia) y a la proliferación y fusión con células satélites (Du y col., 2010). Esta hipertrofia requiere del aumento del número de mionúcleos presentes en las fibras. Como éstos no pueden dividirse en la fibra muscular, la fuente de núcleos debe provenir desde fuera de la célula, siendo dicha fuente las células satélites, que se fusionan con las fibras para proveer de núcleos requeridos en la hipertrofia (Dyton y White, 2008). Las células satélites son capaces de sintetizar ADN y dividirse para luego fusionarse y sintetizar proteína miofibrilar, lo que se corresponde con las propiedades de los mioblastos presuntivos presentes en el músculo embrionario (Allen y col., 1979).

Coincidentemente con el aumento en el número de núcleos en las fibras musculares se encontró una disminución en el número absoluto y porcentaje de células satélites por fibra (Cardasis y Cooper, 1975).

Los factores que afectan el crecimiento fetal y a consecuencia el peso al nacimiento se pueden agrupar en dos categorías: ambientales y genéticos.

Dentro de los factores ambientales que regulan el desarrollo fetal, es la nutrición de la madre durante la gestación uno de los de mayor impacto (Holland y Odde 1992; Osgerby, 2002; Du y col., 2010). Factores en la circulación materna como, glucosa, insulina e IGF-I, regulan la partición de nutrientes entre la placenta y los compartimentos fetales (Wallace y col., 1997, 2001).

La nutrición materna programa el desarrollo fetal especialmente el del músculo esquelético; ya que éste tiene una baja prioridad en cuanto a la partición de nutrientes durante el desarrollo fetal si se lo compara con los órganos vitales, siendo por lo tanto su desarrollo particularmente vulnerable a la disponibilidad de nutrientes (Du y col., 2010).

El flujo sanguíneo útero-placentario es un factor de gran importancia que influye en la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento y desarrollo fetal. La discordancia entre la placenta y el crecimiento fetal, se asocia al sub desarrollo intrauterino (Wu y col., 2006). La restricción de nutrientes en ovejas adultas durante la gestación reduce la proliferación placentaria en el trofoectodermo fetal y disminuye la expresión de factores angiogénicos placentarios (Redmer y col., 2004).

La subnutrición es una de las causas de retardo en el crecimiento intrauterino (Wu y col., 2006), puede alterar el crecimiento y desarrollo fetal debido al aporte disminuido de sustratos a través de la placenta (Funston y col., 2010). La glucosa promueve el crecimiento fetal de manera directa aportando energía y bloques estructurales requeridos para el crecimiento tisular (Fowden, 1997), pudiendo repercutir en el peso al nacimiento del ternero (Holland y Odde, 1992; Greenwood y Cofe, 2007). Existe

evidencia de que el retardo en el crecimiento intrauterino está asociado a alteraciones en la composición muscular y corporal, así como a la distribución del tipo de fibras musculares (Wu y col., 2006).

Osgerby y col. (2002) determinaron un incremento significativo en el peso de los placentomas entre los días 45 y 90 en ovejas gestadas. En las ovejas bien alimentadas el aumento de peso de los placentomas se mantuvo hasta el día 135 de la gestación, mientras que el peso de la placenta en ovejas sub nutridas decreció significativamente a partir del día 90. La restricción nutricional de ovejas gestadas, resulta en una reducción en el número de fibras musculares y aumento en el diámetro de las mismas en corderos de 8 meses de edad (Zhu y col., 2006). Asimismo, la restricción nutricional en vacas durante el primer trimestre de la gestación alteró el tejido muscular de su descendencia, aumentando el área de corte de las fibras musculares y disminuyendo la concentración de proteínas (Phillipou y col., 2007; Long y col., 2010).

La subnutrición durante el período fetal en cerdos ha demostrado disminuir el número de fibras secundarias, llevando a una pérdida permanente del potencial de crecimiento postnatal del músculo (Lefaucheur y Gerrard, 2000).

En contrapartida a los hallazgos previamente mencionados existe evidencia de que la adaptación fisiológica y metabólica de la madre durante la gestación en determinadas circunstancias permite que las variaciones en los niveles nutricionales tengan mínimos efectos sobre el peso al nacimiento del ternero (Holland y Odde, 1992). El crecimiento fetal es máximo en el último trimestre de la gestación, sin embargo la subnutrición materna en este período no necesariamente implica la reducción de peso al nacimiento (Martin y col., 2007).

Dentro de los factores genéticos que influyen en el desarrollo fetal, es el grado de endogamia u homogeneidad antigénica uno de los que repercute sobre el mismo. Es así que la endogamia en general resulta en la disminución del peso al nacimiento en un rango de 0,03 a 0,11kg por cada 1% que aumenta la endogamia (Holland y Odde, 1992).

La heredabilidad del peso al nacimiento es de un rango de 0,4 a 0,45 en el ganado bovino. El efecto de la heterosis puede influir marcadamente sobre el peso al nacimiento, dependiendo del tipo de raza utilizada. La heterosis observada en cruzamientos de razas británicas es por ejemplo del 0 al 5% (Holland y Odde, 1992).

Existe evidencia de que el ambiente uterino es uno de los condicionantes para el desarrollo fetal, habiéndose establecido que la raza de la madre influye sobre el peso del feto (Hafez, 1963) La mayor sensibilidad materna a los antígenos fetales ha sido asociada a placentas más pesadas, probablemente resultando en mayores áreas para el intercambio de nutrientes entre la placenta y el feto (James, 1967). Placentas mayores y por ende fetos más pesados se observan a medida que la disparidad antigénica aumenta (Billington y col., 1964).

En trabajos realizados en ratones se ha reportado que el peso de la placenta es menor en aquellos en que la hembra y el feto son antigénicamente similares o endogámicos (Billington y col., 1964).

Eje Somatotrópico:

El eje somatotrópico, también conocido como eje hormona de crecimiento (GH)-factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), consiste en hormonas peptídicas, receptores de superficie celular y proteínas de unión (Denley y col., 2005). Éste es crítico en la regulación del crecimiento, desarrollo y diferenciación del músculo esquelético (Clemmons, 1997; Duan y Xu, 2005; Duan y col., 2010; Keady, 2011).

Hormona de crecimiento:

La regulación del crecimiento y el desarrollo por acción de la GH es mediado por receptores unidos a la membrana plasmática (GHR), lo que desencadena múltiples señalizaciones intracelulares (Herrington y col., 2000), de las cuáles la transductora de señales Janus kinasa 2 (JAK2) y el activador de transcripción 5 (STAT5) son responsables de la regulación de varios genes, entre ellos los factores de crecimiento similares a la insulina tipo uno (*IGF1*) (Wang y Jiang, 2005).

El STAT5 es esencial para la expresión del gen *IGF1* en el hígado estimulado por la GH, sin embargo este factor de transcripción es predominante en el músculo esquelético si se lo compara con otros tejidos (Klover y Hennighausen, 2007). Es así que el trabajo realizado por los autores previamente citados en el que se utilizaron ratones genéticamente modificados, a los que se les anuló el gen para STAT5 en el tejido muscular, se observó una reducción del 60% del contenido de ARNm de *IGF1* en este tejido, sin alterar la expresión de ARNm de *IGF1* en el hígado y solo levemente los valores circulantes del mismo. Además estos ratones fueron 12% más pequeños que el grupo control. De aquí se desprende que la producción de *IGF1* dependiente de GH en el músculo esquelético esta mediada por el STAT5 y que la producción local de IGF-I es más importante para el desarrollo posnatal que sus niveles circulantes producidos en el hígado.

El efecto anabólico de la GH en el músculo esquelético, mediado por la acción de IGF-I, regula el crecimiento muscular mediante sus acciones metabólicas y anabólicas e interviene en la miogénesis durante el desarrollo, regeneración e hipertrofia muscular (Phillippou y col. 2007; Dyton y White 2008).

Ge y col. (2012) encontraron que ni a concentración fisiológica ni supra fisiológica de GH agregada a cultivos de mioblastos bovinos hubo efecto en su proliferación. Este resultado llevaría a pensar que si bien la GH estimula la proliferación de células satélites o mioblastos, este efecto probablemente no es debido a la acción directa de GH en estas células. Sin embargo en este estudio también investigaron la posibilidad de que GH estimulara el crecimiento muscular mediante la estimulación de la síntesis proteica a nivel celular o inhibición de la degradación proteica, y hallaron que agregando concentraciones fisiológicas de GH a cultivos celulares bovinos, la concentración proteica en los miofibrillos aumentó un 15%. La misma se debió al estímulo en la síntesis de proteínas y no a la inhibición en su degradación.

El crecimiento muscular también puede resultar del aumento de la fusión de mioblastos en miofibrillos. Pero Ge y col. (2012), observaron que el agregado de GH en cultivo celular no tuvo efecto en la producción de ésta fusión. Coincidiendo esta observación *in vitro* con lo hallado *in vivo* por Vann y col., (1998), donde observaron que la administración de GH exógena no alteró el número de núcleos por miofibrillos en el ganado. Es así que la GH estimularía el crecimiento del músculo por

estímulo en la síntesis proteica sin afectar el número de núcleos por miofibras ni el número de fibras por músculo (Ge y col., 2012, Vann y col., 2001).

Ge y col. (2012) observaron además que mientras el agregado de GH, ya fuera a concentraciones fisiológicas o supra fisiológicas, no tuvo efecto en la proliferación de mioblastos bovinos, el agregado de IGF-I a concentraciones fisiológicas sí estimuló la proliferación de estas células. Además la adición de IGF-I tuvo un efecto positivo mayor sobre la acumulación proteica en los miotúbulos comparada con GH, promoviendo la síntesis proteica e inhibiendo la degradación de proteínas en los mioblastos.

La síntesis y secreción de IGF-I es independiente de GH durante el desarrollo temprano y esta independencia se puede extender a órganos específicos como las gónadas durante el desarrollo posterior (Nakae y col., 2001). Es así que un trabajo realizado en ratones en el que se les anuló el gen para GH o para GHR no hubo restricción significativa del crecimiento fetal, sugiriéndose entonces que la acción promotora de IGF es independiente durante el desarrollo del feto (Le Roith y col., 2001). La adición de GH a concentraciones tanto fisiológicas como supra fisiológicas a cultivos de mioblastos bovinos no estimuló la expresión de ARNm de *IGF1* (Pell y col., 1993; Ge y col., 2012).

Por otra parte, el estatus nutricional tiene una influencia fundamental sobre el eje somatotrópico y la regulación del nivel de GHR (Dauncey y col., 1994). El efecto de la regulación ejercida por la nutrición sobre la expresión de ARNm de *GHR* se manifestaría de manera distinta según se trate de tejido hepático o muscular, habiéndose observado que dietas ricas en energía ocasionaron una mayor expresión de ARNm de *GHR* en el hígado mientras que la disminuyeron en el músculo esquelético. A su vez se observó un aumento de la expresión de ARNm de *GHR* en el músculo esquelético cuando la disponibilidad de energía para el crecimiento se vió reducida (Dauncey y col., 1994). Sin embargo, Combes y col. (1997) al realizar una restricción nutricional del 30% de los requerimientos durante un período de tiempo prolongado en cerdos, observaron que la expresión de ARNm de *GHR* tanto en músculo esquelético como hígado fue mayor en los animales restringidos respecto a los controles. A pesar de ésto el rango de crecimiento obtenido en los grupos no tuvo diferencia significativa.

La sobre alimentación de las madres entre los días 25 y 50 de gestación o la inyección de GH entre los días 10 y 24 incrementó el número total de fibras en los cerdos en desarrollo (Lefaucheur y Gerrard, 2000). Por otra parte bovinos alimentados en altos niveles tuvieron mayores niveles de GH unida a su receptor (GHR) en el hígado en un 92% y aumentaron la concentración de proteína ligadora de GH (GHBP) en el plasma en un 70% (Vestergaard y col., 2003). Los efectos de GH son mayores en animales bien alimentados comparado con animales sub nutridos. La administración de GH bovina exógena puede estimular el rango de crecimiento hasta en un 25% en novillos y vaquillonas y tendiendo a aumentar la ganancia diaria (Vestergaard y col., 2003).

La inanición prolongada generalmente resulta en la supresión del crecimiento corporal con la reducción concomitante de los niveles circulantes de IGF-I. Esta reducción está paradójicamente asociada al aumento de GH en plasma lo que probablemente sería producto de la ausencia de feed-back negativo en la pituitaria (Thissen y col., 1994).

En el músculo *longissimus* en bovinos la densidad de los receptores de IGF-I fue mayor en los animales alimentados a altos niveles pero no así en los tratados con GH. El tratamiento con GH aumentó también la concentración de IGF-I (total y libre) en plasma pero sobre todo en el grupo de alta ingesta (Vestergaard y col., 2003).

Factores de crecimiento similares a la insulina:

Varios factores de crecimiento influyen en la proliferación y diferenciación durante la miogénesis, siendo el sistema (IGF) uno de los más importantes. La acción de *IGF1* (mediada por proteínas de unión, IGFbps y actuando sobre receptores específicos, IGFR1) estimula la diferenciación celular y síntesis proteica (Baxter, 2000; Oksbjerg y col., 2004).

Las IGF-I e IGF-II son polipéptidos de cadena simple estructuralmente similares a la proinsulina. La forma madura de las IGF contiene cuatro dominios bioquímicamente diferentes (B-C-A-D). La presencia del dominio D (carboxi terminal) distingue la forma madura de IGF de la pro insulina (Wood y col., 2005).

Las IGF juegan un rol central en la regulación neuroendocrina del crecimiento de los vertebrados (Wood y col., 2005). Tanto las IGF como la miostatina son moderadores críticos del desarrollo muscular. Mientras que las IGF estimulan la proliferación de mioblastos, la miostatina la inhibe (Bass y col., 1999).

Están identificadas dos isoformas de *IGF1*: la clase dos (endocrina) que es predominante en el hígado y la clase uno (autócrina/parácrina) que es localmente expresada en el músculo esquelético y otros tejidos (Philippou y col., 2007), jugando un papel preponderante en el soporte del crecimiento del músculo (Dayton y White 2008). Sin embargo la IGF-I circulante (estimulada por la GH) podría tener un rol indirecto en el crecimiento del músculo a través del crecimiento y elongación de los huesos, de esta manera las señales mecánicas estarían involucradas en el aumento de la producción local de IGF-I (Pieter y col., 2004).

Las actividades de IGF-I e IGF-II consisten en estimular la mitogénesis, aumentar el aprovechamiento de sustratos y la actividad metabólica, inhibir la apoptosis y modular varias funciones específicas según el tipo celular (Baxter, 2000). La IGF-I regula la miogénesis mediante la inducción de la expresión del gen de la miogenina (Stickland y col., 2004), y estimulando tanto la proliferación, como la fusión de mioblastos (Lefaucheur y Gerrard 2000). Sin embargo la proliferación (actividad mitótica) y la diferenciación (expresión de proteínas músculo-específicas) son procesos mutuamente excluyentes, cuya acción está mediada por el mismo IGFR1 (Florini y col., 1996). En condiciones *in vitro*, altas concentraciones de IGF-I favorecen la proliferación de mioblastos, mientras que concentraciones menores promueven su diferenciación (Coolican y col., 1997).

La IGF-I actúa aumentando la captación de glucosa y aminoácidos por el músculo y disminuyendo su degradación. Induce además la proliferación de células satélites que colaboran en el aumento de masa muscular en su conjunto (Oksbjerg y col., 2004). A su vez su expresión aumentada y sostenida a nivel local, promueve la regeneración e hipertrofia de fibras musculares y aumenta los niveles de factores reguladores de la miogénesis así como el ARNm para proteínas contráctiles (Philippou y col.2007). Se ha determinado que en el músculo de cerdos (unos de los mamíferos de más rápido crecimiento) hay niveles considerablemente mayores de

IGF-I que en otras especies. La producción de sarcómeros adicionales al final de las miofibrillas existentes durante el crecimiento longitudinal del músculo se asocia a una mayor expresión del gen *IGF1* (Pieter y col., 2004).

En trabajos realizados en ratones en los que se inactivaron los genes para *IGF1*, *IGF2* o *IGFR1* se observó que cuando se bloquea *IGF1* o *IGF2* hay un retardo en el crecimiento, mientras que cuando se bloquearon ambos genes *IGF1* e *IGF2* o el receptor *IGFR1* los neonatos tuvieron la mitad del tamaño esperado y murieron al poco tiempo de nacer (Baker y col., 1993; Liu y col., 1993; Nakae y col., 2001).

Diversas observaciones indican que la IGF está regulada por la insulina, el estatus nutricional y la GH (Philips y Kaytor 1999). Se ha demostrado que el aumento en la secreción de IGF-I está directamente relacionado a los valores de insulina. Es así que en un trabajo llevado a cabo por Oliver y col. (1996), en el que se realizó ayuno durante 48 h en ovejas gestantes, al medir glucosa e insulina en plasma materno y fetal se constató la caída de ambos valores, acompañados por la disminución del IGF-I en el plasma fetal. Si bien la IGF-I de origen materno no puede atravesar las membranas placentarias, los niveles elevados de este factor en la madre aumentan el transporte de nutrientes a través de la placenta siendo éstos responsables del aumento de la producción de IGF-I fetal (Stickland y col., 2004). De esta manera placentas pequeñas que no logran proveer un adecuado aporte de nutrientes, resultan en un estado crónico de subnutrición fetal. Esto se encuentra asociado a la menor expresión para genes de *IGF1* en fetos con retardo en el crecimiento (Rhoads y col., 2000).

De aquí se desprende que la regulación de los niveles de IGF-I dependen de la nutrición. Por ejemplo se ha demostrado que el estatus nutricional afectaría los niveles de IGF-I más que de otras proteínas hepáticas como la albumina o la transferrina (Clemmons y col., 1985). Además, niveles de IGF-I circulante disminuidos en condiciones de mal nutrición se acompañan de menor expresión de IGF-I en el hígado y otros tejidos. Esto estaría en parte explicado por los niveles diferenciales de ARNm para la expresión de *IGF1* observados en hepatocitos en cultivo celular en relación a diferentes concentraciones de aminoácidos disponibles en el medio. Resultando la disminución de aminoácidos en una menor transcripción del gen (Philips y Kaytor, 1999).

Las IGF están asociadas a una familia de proteínas ligadoras de alta afinidad (IGFBP-1 a 6) que afectan su actividad biológica mediante su unión a IGF-I e IGF-II (Dayton y White 2008). Las IGFBP tienen un dominio amino terminal en su estructura así como uno carboxi-terminal, ambos importantes para su unión a IGF (Baxter, 2000). Estas proteínas regulan la vida media y la concentración en la circulación de IGF-I libre condicionando su biodisponibilidad en el músculo (Phillipou y col., 2007; Duan y col., 2010). A su vez controla su bioactividad mediante la regulación de la permeabilidad del endotelio de los capilares y su acceso a *IGFR* tisulares (Philips y Kaytor 1999), que serán responsables del efecto biológico (Dayton y White 2008).

El *IGFR1* es un miembro de la súper familia tirosin quinasa de receptores trans membrana y es el mediador clave para la señalización de IGF en los mamíferos (Wood y col., 2005). Una vez que el IGF se ha unido a su receptor éste cambia de conformación llevando a la activación de su tirosin quinasa. La misma autofosforila

tirosin adicionales que actúan como sitio para la señalización proteica (Clemmons, 2009).

La falta de IGFR1 en el músculo resulta en una disminución del tamaño muscular y el número de células durante el desarrollo fetal, sin embargo cuando la hiperplasia compensatoria ocurra luego del nacimiento determinará una masa muscular normal en la adultez (Clemmons, 2009).

La expresión de *IGFR1* es mayor en el músculo faenado en bovinos de menor tamaño al nacimiento, sugiriendo que el aumento en la expresión de este gen actúa como un efecto compensatorio en animales de menor peso para promover el crecimiento muscular (Micke y col., 2011).

La sobre expresión de cualquiera de las isoformas de las IGFBP inhibe la acción de IGF-I mediante la inhibición de su unión al IGFR1 (Mukherjee, 2008). La mayoría de las IGFBP, incluidas las IGFBP 2 a 6 se expresan en las células de los tejidos periféricos de los mamíferos, expresando más de una forma de IGFBP cada tipo celular (Jones y Clemmons, 1995; Firth y Baxter, 2002; Jogie-Brahim y col., 2009; Yamanda y Lee, 2009).

Las IGFBP3, 4, 5 y 6 son expresadas en el músculo esquelético y a mayores niveles en el músculo del neonato que en el adulto. La IGFBP3 se expresa mayormente en los macrófagos adyacentes al musculo lesionado (Jennische, 2000), y es además el principal transportador de IGF en la circulación (Philips y Kaytor, 1999), mientras que IGFBP5 se expresa en los mioblastos durante la regeneración (Clemmons, 2009).

La expresión genética de IGFBP5 en el músculo bovino es significativamente menor en terneros al nacimiento con respecto a fetos en el día 60, 135 y 195 de la gestación, sugiriendo que IGFBP5 juega un rol importante en el desarrollo muscular temprano (Lehnert y col., 2007). En modelos in vitro se ha demostrado que la IGF-I regula positivamente la IGFBP5, la adición de esta proteína de unión en células miogénicas en proliferación o diferenciación inhibe la proliferación estimulada por IGF-I, mientras que estimula el efecto en la diferenciación debido a la misma (Ewton y col., 1998).

Por otra parte, en un trabajo realizado en ratones se determinó que existe una compensación entre los miembros de la familia IGFBP previniendo de esta manera la manifestación de alteraciones fenotípicas dramáticas en individuos carentes de un solo tipo de IGFBP. Fue así que niveles elevados de IGFBP1, 3, 4 y 5 se encontraron en ratones carentes de IGFBP2 (De Mambro y col., 2008., Wood y col., 2000). Ratones carentes de IGFBP 3, 4 y 5 mostraron un tamaño significativamente menor del músculo cuádriceps (Ning y col., 2008).

Adipogénesis y su regulación:

La adipogénesis se refiere al proceso de diferenciación de los preadipocitos (células precursoras) en adipocitos capaces de acumular lípidos así como de expresar y secretar diversas hormonas y citoquinas (Houseknecht y col., 2002).

Existen cuatro sitios fundamentales de depósito graso en los animales: visceral, subcutáneo, intermuscular e intramuscular. La acumulación grasa en los tres

primeros implica un gran gasto de energía sin mejorar la producción, ya que la grasa intramuscular es la que condiciona la calidad de la carne (Du y col., 2011).

Durante el desarrollo intrauterino se forman adipocitos intramusculares que serán sitios de acumulación de grasa durante el engorde de los animales (Du y col., 2010). La acumulación intramuscular de grasa está asociada a factores genéticos, del desarrollo y nutricionales del animal (Wang y col., 2009). El marmoleo está correlacionado al número de adipocitos y al tipo de ácidos grasos que se depositan en el músculo esquelético (Lee y col., 2012). El mismo es crucial para la palatabilidad de la carne, conociéndose que niveles de grasa intramuscular mayores al 2,5% mejoran la ternura y jugosidad de la carne (Lefaucheur y Gerrard, 2000).

El periodo de mayor generación de adipocitos intramusculares es la vida fetal (Du y col., 2010). La adipogénesis se inicia alrededor de la mitad de la gestación en los rumiantes, la que parcialmente se solapa con la segunda onda de la miogénesis o formación de fibras secundarias (Du y col., 2010). A su vez está profundamente influenciada por varias hormonas y señalizaciones nutricionales, siendo la insulina, la IGF-I, GH y los corticosteroides, importantes señales positivas para la diferenciación de los adipocitos, así como para la transcripción de factores adipogénicos (Brun y col., 1996). Por lo tanto sería más efectivo en estadios tempranos del desarrollo mejorar la nutrición materna debido a la presencia de un número abundante de células pluripotenciales en el músculo esquelético (Du y col., 2010). El manejo de la nutrición materna en este período estimula a las células mesenquimales a convertirse en adipocitos aumentando así el marmoleado (Lefaucheur y Gerrard, 2000).

Cuando el desarrollo muscular en los fetos se ve comprometido por carencias nutricionales de la madre, se reduce la masa muscular desviando esta energía hacia el acúmulo de grasa, produciéndose éste en el espacio visceral y subcutáneo. Esto da como resultado crías que si bien son más livianas al nacimiento, tienen carcazas más engrasadas, en desmedro de la calidad de la carne (Du y col., 2011; Zhu y col., 2006). Se ha demostrado que un alto número de fibras musculares estuvo vinculado a un menor depósito de grasa, lo que puede explicar la mayor eficiencia de crecimiento de estos animales (Dwyer y col., 1993).

La adipogénesis está regulada por varios factores de transcripción, como por ejemplo, el Receptor activador de proliferación de peroxisomas (PPAR). El PPAR, miembro de la familia de los receptores hormonales nucleares, (Mangelsdorf y col., 1995) es un factor de transcripción que se activa por ligando, siendo éstos los ácidos grasos. (Du y col., 2010). Existen tres miembros distintos dentro de la familia de los PPAR en los mamíferos: alfa (*PPARA*), delta (*PPARD*) y gama (*PPARG*) (Fajas y col., 2001). Al igual que otros miembros de la super familia de receptores esteroideos/tiroideos, los PPAR interactúan con sitios de unión de genes blanco cuya transcripción es dependiente de ligando (Mangelsdorf y col., 1995).

La activación del *PPARG* promueve la diferenciación a través de la inducción de un rango de genes importantes para la toma y almacenamiento de triglicéridos y proteínas transportadoras de ácidos grasos (Du y col., 2010). Hay además tres isoformas de *PPARG*: *PPARG1*, *PPARG2*, *PPARG3*. *PPARG1* y *3* se observan en varios tejidos mientras que *PPARG2* se observa predominantemente en el tejido adiposo. Ren y col. citados por Fève, (2005) usaron pre adipocitos deficientes en

PPARG2 y demostraron que esta isoforma es necesaria para que la adipogénesis se produzca.

La expresión de este factor es tan importante para la diferenciación del tejido adiposo que en estudios realizados tanto en líneas celulares fibroblásticas como en precursores de células musculares cuando fueron infectados con retrovirus expresando *PPARG*, éstas se diferenciaron en adipocitos resaltando el importante rol adipogénico del *PPARG* (Tontonoz y col., 1994; Hu y col., 1995).

Estudios realizados por Tong y col. (2008) en ovejas concluyeron que las que fueron suplementadas previo y durante la primer mitad de la gestación tuvieron una mayor expresión de ARNm de *PPARG* en el músculo fetal. En concordancia con estos resultados Muhlhausler y col. (2007), determinaron que aumentando la nutrición materna en ovejas gestadas aproximadamente en un 155% de los niveles de energía de mantenimiento, se obtuvieron aumentos significativos de los niveles plasmáticos de glucosa materna y fetal asociados a aumentos significativos en la expresión de ARNm de *PPARG* en los adipocitos del feto. Estos hallazgos sugieren que la exposición a una nutrición mejorada previo al nacimiento resulta en aumento en la capacidad lipogénica del tejido adiposo.

Se ha demostrado además en cerdos que la abundancia de *PPARG* en tejido adiposo está regulada por el estatus nutricional. La privación de alimento reduce la abundancia de ARNm de *PPARG2*, mientras que no afecta la expresión de *PPARG1*. Es así que, en esta especie, la expresión de *PPARG2* es regulada por los ácidos grasos de la dieta (Houseknecht y col., 2002). El mecanismo que subyace sobre la regulación diferencial de *PPARG2* vs *PPARG1* aun no está dilucidado. Sin embargo sí se conoce que los ácidos grasos regulan la transcripción genética actuando como ligandos para receptores nucleares (como es el caso de los PPAR), uniéndose directamente al ADN y regulando la transcripción (Houseknecht y col., 2002).

La proteína de unión reguladora de esteroides conocida por su sigla en inglés como SREBP1 induce la diferenciación temprana de adipocitos (Tontonoz y col., 1993; Kim y Spiegelman 1996). Este factor de transcripción juega un rol pivote en la homeostasis del colesterol y regula la expresión de varios genes vinculados al metabolismo de ácidos grasos (Houseknecht y col., 2002). El ADD1/SREBP1 podría estar implicado en la generación de ligando para *PPARG* y estimularía la actividad transcripcional del mismo (Fajas y col., 2001; Houseknecht y col., 2002; Fève 2005).

Este factor podría jugar un rol particular en el metabolismo lipídico vinculado al estatus dietético, ya que se vio marcadamente disminuido durante la retirada de alimento e inducido por la alimentación (Horton y col., 1998). Es así que el SREBP1 junto a la composición de la dieta (en particular su contenido en ácidos grasos poli insaturados) y los PPARA y G regulan la expresión génica para la proteína delta 9 desaturasa (SCD) (Grauagnard y col., 2009; Waters y col., 2009). El rol de la SCD es clave en la formación a nivel tisular de ácidos linoleicos conjugados que formarán parte de la composición grasa de la carne (Griinari y col., 2000). Estos ácidos grasos son reconocidos como benéficos para la salud humana, siendo mayor su producción en animales alimentados a base de forraje respecto a aquellos alimentados con grano (Dervishi y col., 2010).

HIPÓTESIS

El número y tamaño de las fibras musculares en los terneros hijos de vacas sometidas a bajas ofertas de forraje durante la gestación se verá afectado negativamente respecto a los hijos de vacas en alta oferta de forraje. A su vez esta repercusión negativa se vería amortiguada por efecto de la heterosis en hijos de vacas cruza.

Tanto la expresión de los genes pertenecientes al eje somatotrópico como los vinculados a la adipogénesis se verán también afectados de manera negativa en terneros hijos de vacas en baja oferta de forraje durante la gestación.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Caracterizar la relación entre la nutrición materna durante gestación y las características del músculo esquelético en terneros hijos de vacas cruza y puras.

Objetivos Específicos:

1. Evaluar el efecto de la oferta de forraje del campo natural a lo largo de la gestación sobre el número y tamaño de fibras musculares de terneros hijos de vacas puras (Angus y Hereford) y cruza (F1) al nacer.
2. Evaluar el efecto de la oferta de forraje del campo natural a lo largo de la gestación sobre la expresión de genes del eje somatotrófico en el músculo *Semitendinoso* de terneros hijos de vacas puras (Angus y Hereford) y cruza (F1) al nacer.
3. Evaluar el efecto de la oferta de forraje del campo natural a lo largo de la gestación sobre la expresión de genes relacionados con la adipogénesis en el músculo *Semitendinoso* de terneros hijos de vacas puras (Angus y Hereford) y cruza (F1) al nacer.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en la Estación Experimental Bernardo Rosenghurt (EEBR; Facultad de Agronomía, Bañados de Medina, Cerro Largo) y el mismo fue realizado de acuerdo a protocolos aprobados por la Unidad Experimental y por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, UdelaR).

Diseño experimental, tratamientos y animales:

El experimento se realizó en un diseño de bloques completos al azar con dos repeticiones según tipo de suelo (bloque 1: 32 ha y bloque 2: 15 ha). Se utilizaron 40 terneros hijos de las vacas puras (PU) (Hereford, H y Angus, A) y cruza (CR) F1 (HxA y AxH) pastoreando las ofertas de forraje bajas (BO) y altas (AO) (2.5 vs. 4 kgMS/kgPV en promedio, respectivamente) variables a lo largo del año (5, 3, 4, y 4 kgMS/kgPV y 3, 3, 2, y 2 kgMS/kgPV para AO-HA y BO-HA en otoño, invierno, primavera y verano, respectivamente).

Los tratamientos de oferta de forraje se calcularon de acuerdo a Sollenberger y col., (2005) y se ajustaron mensualmente, después de medir la cantidad de forraje disponible en cada parcela (Haydock y Shaw, 1975), en caso de ser necesario, a través del ingreso de animales volantes (Mott, 1960) de similar grupo genético y condición fisiológica. Los tratamientos de oferta de forraje determinaron cambios en la masa y altura del forraje (Tabla 1). La composición química promedio durante el período promedió 100 ± 16 y 746 ± 37 g/kg de proteína cruda y fibra detergente neutro, respectivamente.

Las vacas experimentales (madres de los terneros evaluados) pertenecían o eran descendientes de un rodeo experimental generado como parte de un experimento dialéctico que se llevó a cabo durante 10 años en la EEBR (Espasandin y col., 2006). Las vacas se manejaron como un grupo contemporáneo y pastorearon en el mismo tratamiento nutricional (alta o baja oferta de forraje) desde Mayo 2007, habiendo gestado y amamantado un ternero por año desde esa fecha hasta 2009. Los padres de los terneros fueron de raza Hereford o Angus, determinando que los terneros hijos de vacas puras fueran cruce F1 mientras que los hijos de vacas cruce fueran retro-cruza.

Se incluyeron terneros nacidos durante la parición de primavera del 2009 (desde Octubre a Noviembre). Es así que los terneros fueron sometidos al efecto de la oferta de forraje desde la concepción hasta el nacimiento (Noviembre 13 2009 \pm 15 días). Se evaluaron 10 terneros ($n = 5$ machos y 5 hembras) por tratamiento, quedando condicionado cada uno de los tratamientos por la interacción oferta de forraje y grupo genético, (AOPU, AO CR, BOPU y BO CR).

Al nacimiento se determinó el peso vivo (PV) de los terneros y se colectaron muestras del músculo *Semitendinoso* mediante biopsias (primeras 72h). Las biopsias de músculo *Semitendinoso* fueron tomadas en la zona correspondiente al punto de unión de éste con el músculo *Semimembranoso*, a 3 cm de este último y a 6 cm del isquion (Anexo 1). Luego de lavar, realizar la tricotomía, aplicar antiséptico

y anestesiarse localmente la región (Lidocaína 2%, 4 ml), se colectó con bisturí una muestra de 2 cm³ (aproximadamente 2 g). La muestra se lavó con suero fisiológico conservándose la mitad de la misma (1cm³) en solución bufferada de paraformaldehído al 4% para realizar determinaciones histológicas. La otra mitad se conservó en N₂ líquido para luego ser almacenada en un freezer a -80°C hasta su posterior análisis molecular.

Determinaciones Histológicas:

El procesamiento histológico se llevó a cabo en el Laboratorio de Histología y en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria (UdelaR).

Las muestras fueron incluidas en bloques de parafina mediante técnicas histológicas estándar (Anexo 2) y se realizaron cortes transversales seriados en la región media de la muestra (6 µm; micrótopo modelo 2030 Reichert-Jung, Alemania), obteniéndose 4 muestras de cada animal; ya que se considera que las diferencias en el número de fibras estimadas a partir de la porción media del músculo representan la diferencia real en el número total de fibras musculares (Dwyer y col., 1993).

Se realizó la tinción de las muestras con hematoxilina-eosina (Anexo 3) para visualizar la morfología del músculo (Bayol y col., 2004). Las imágenes del músculo (4 áreas en cada una de las 4 muestras, conformando un total de 16 imágenes/muestra) fueron capturadas usando un microscopio óptico (Olympus BX50, Olympus Tokyo, Japón) equipado con una cámara fotográfica INFINITY1-3c (3.1 Megapixel Color CMOS Camera, y LuSDK: Software Developer's Kit, Lumenera Corporation, Ottawa, Canadá) y analizados con el software de análisis de imágenes INFINITY Camera Software v%. 0.3 (Lumenera Corporation).

Se calculó el número de fibras mediante el examen de un mínimo de 450 fibras musculares por animal y el diámetro se determinó como promedio del diámetro aparente mayor y menor de 300 fibras como mínimo. Esto se realizó para minimizar los errores asociados con las fibras que no se hubieran cortado exactamente perpendiculares a la dirección de la misma.

Se estimó el número total de fibras musculares aparentes a partir del área de sección transversal y la densidad de las fibras musculares como número de fibras/µm².

RT-PCR en tiempo real:

La extracción de ARN total y la síntesis de ADNc se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Producción Animal y Pasturas de Facultad de Agronomía (UdelaR) y la cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real se realizó en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de Facultad de Veterinaria (UdelaR).

El ARN total se extrajo de las muestras de tejido muscular conservadas a -80°C, utilizando TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU), seguido por una precipitación en cloruro de litio y un tratamiento DNasa con DNA-Free Kit

(Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX, EEUU) para eliminar restos de ADN contaminante.

La concentración de ARN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE, EEUU).

La pureza e integridad del ARN aislado fue evaluada en rangos de absorbancia de 260/280 y 260/230 y por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

La transcripción reversa fue realizada con SuperScript®III Transcriptase (Invitrogen) usando hexámeros aleatorios y 1µg de ARN total como molde.

El ADNc obtenido se almacenó a -20° hasta su posterior procesamiento por RT-PCR en tiempo real cuantitativo.

Se utilizaron primers específicos (Tabla 2) para amplificar el ADNc de los genes blanco: *GHR*, *IGF1*, *IGF1R*, *IGFBP3*, *IGFBP5*, *PPARG*, *SREBF1*, y dos controles endógenos, hipoxantina fosforibosiltransferasa (*HPRT*) y β-actina (*ACTB*), obtenidos de la literatura o diseñados en base a la secuencia bovina (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Antes de su uso, se corroboró el tamaño (mediante un gel de agarosa al 1%) y se secuenció (Macrogen Inc. Seul, Corea) el producto amplificado (resultados no mostrados).

La abundancia de ARNm se midió por RT-PCR en tiempo real utilizando para estas reacciones 7,5 µL de KAPA SYBR® FAST Universal 2X qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, inc. Woburn, MA, EEUU), concentraciones iguales (200nM) de primers sentido y antisentido (Operon Biotechnologies GmbH; Cologne, Alemania), y 3 µL de ADNc diluidos (1:7.5 en agua libre de ARNasa/ADNasa) en un volumen final de 15 µL.

Las muestras fueron analizadas por duplicado en un disco de 72 tubos en un Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia). Las condiciones de la amplificación estándar fueron de 5 min a 95°C y 40 ciclos de 10 seg a 95°C, 45 seg a 60°C y 20 seg a 72°C. Se corrieron curvas de disociación en todas las muestras para detectar dímeros de primers, contaminación o presencia de otros amplicones. Cada disco incluyó un pool de ADNc de muestras del músculo analizadas por triplicado para ser utilizado como la base para la comparación de los resultados (control exógeno) y tubos de agua en duplicado como control negativo. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayos fueron menores a 7.6 y 12.3%, respectivamente.

Se midió la expresión génica mediante la cuantificación relativa de un control exógeno (Pfaffl, 2009) y normalizada a la expresión de los controles endógenos (*HPRT* y *ACTB*) corregidos por la eficiencia de amplificación. Tanto *HPRT* como *ACTB* han sido previamente utilizados como controles endógenos en muestras de músculo esquelético (Feng y col., 2010, Ogborn y Gardiner, 2010). La eficiencia de amplificación de los genes blanco y de los controles endógenos se estimó mediante una regresión lineal de las curvas de dilución del ADNc.

Análisis Estadístico:

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico SAS (SAS 9.0V, SAS Institute Inc, Cary, NC, EEUU). Los datos de diámetro y densidad de fibras musculares y expresión de genes en músculo se analizaron usando el procedimiento MIXED con un modelo que incluyó la oferta de forraje, el grupo genético de la madre, su interacción y el sexo como efectos fijos, el bloque y la raza del padre como efectos aleatorios y la fecha de nacimiento como covariable. La separación de medias se realizó con una prueba de mínima diferencia significativa ($\alpha = 0,05$). Los datos fueron expresados como media (LSMeans) \pm error estándar de la media (ESM). Las medias se consideraron diferentes cuando $P \leq 0,05$ y la tendencia a diferir entre medias se estableció cuando $0,05 < P \leq 0,10$.

Tabla 1. Oferta, masa y altura de forraje y estatus fisiológico de la vaca a lo largo del año.

	Otoño	Invierno	Primavera
Oferta de Forraje (KgMS/KgPV)			
Alta	5	3	4
Baja	3	3	2
Masa de forraje (KgMS/ha)*			
Alta	1592 \pm 189 ^{ab}	821 \pm 189 ^{cd}	1695 \pm 189 ^{bc}
Baja	928 \pm 189 ^{bcd}	476 \pm 189 ^{cd}	1098 \pm 189 ^{cde}
Altura (cm)			
Alta	2.9 \pm 0.4 ^{bc}	2.4 \pm 0.4 ^d	3.4 \pm 0.4 ^c
Baja	1.5 \pm 0.4 ^d	1.6 \pm 0.4 ^d	2.7 \pm 0.4 ^{de}
Días de gestación	60-150	150-240	240-282

^{a,b} Medias con literales diferentes difieren con $p < 0.05$

*Lsmeans \pm ESM.

Tabla 2. Primers usados para la cuantificación de los genes de interés y controles endógenos.

Gen ¹	Banco de genes		Secuencia de primers	Largo (pb)
IGF1 ^a	XM 61412	Sentido	CCAGACAGGAATCGTGGATG	89
		Antisentido	ACTTGGCGGGCTTGAGAG	
IGF 1R	XM 606794.3	Sentido	GACCATCAAAGCTGGGAAAA	116
		Antisentido	TTATGTCCCCTTTGCTCTGG	
IGF 1R	NM 174556	Sentido	AGCACAGACACCCAGAACTTCT	86
		Antisentido	TTCAGCGTGTCTTCCATTTCC	
IGFBP3 ^a	NM 001105327.1	Sentido	CGCCTGAGATGAGACAGAAA	121
		Antisentido	TCACAGTTGGGCAGGTACAC	
IGFBP5	NM 181024.2	Sentido	CAGTGTCTGCAAGGACCTCA	128
		Antisentido	GATGTCAAAGGCATGGGAGT	
PPARG	NM 001113302.1	Sentido	CTACATCCGCTTCCTTCAGC	93
		Antisentido	TCCTTCAGCGATTTGCTTTT	
SREBF1	XM 580802	Sentido	TGGAGAAGGTGTTTATTCCTCATG	105
		Antisentido	CACAGAGGGCCACAATGTGA	
HPRT ^a	BT 030480	Sentido	CGTGGCTACAGCTTACC	53
		Antisentido	GAAATCGTCCGTGACATCAA	

¹GHR=receptor de hormona de crecimiento, IGF1= Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1, IGF1R= receptor para IGF, IGFBP3=proteína de unión tipo 3 para IGF, IGFBP5= Proteína de unión tipo 5 para IGF, PPARG= Receptor activador de proliferación de peroxisomas, SREBF1=Gen para la proteína de unión reguladora de esteroides, HPRT=hipoxantina fosforibosyltransferasa, ACTB= β -actina, ^aCarriquiry y col., 2009. ^bLaporta y col.,2012

RESULTADOS

El PV de los terneros al nacer no difirió entre tratamientos (39,6, 38,6, 38,2 y 42,8 kg \pm 2.7 para AOPU, BOPU, AOCR, BOCR, respectivamente), siendo mayor ($P = 0.001$) en machos que en hembras (42.3 vs. 37.2 \pm 2.6 kg)

La densidad de las fibras musculares del *Semitendinoso* al nacimiento tendió ($P=0.089$) a ser afectada por la interacción entre oferta de forraje y genotipo materno, siendo menor en terneros BO-CR que en los terneros de los otros tres grupos. Mientras que el diámetro de las fibras musculares no fue afectado por la oferta de forraje ni el genotipo materno (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la oferta de forraje en la nutrición materna durante la gestación sobre el número y diámetro de fibras musculares, medidas en el músculo *Semitendinoso* de los terneros al nacimiento.

Fibras	Tratamiento ^a				Valores-P ^b			
	AOPU ¹	AOCR ²	BOPU ³	BOCR ⁴	ESM*	OF	RM	OFxRM
Densidad (fibras/ μm^2)	5,5 x10 ⁻⁴	5,7x10 ⁻⁴	6,0x10 ⁻⁴	4,2x10 ⁻⁴	0,68x10 ⁻⁴	0.430	0.171	0.089
Diámetro (μm)	42.0	41.3	42.3	49.4	2.5	0.109	0.211	0.135

^aTratamiento según oferta de forraje y tipo genético: ¹Alta oferta, Puras; ² Alta oferta, Cruzas; ³Baja oferta, Puras; ⁴Baja oferta, Cruzas.

*Desvío Standard.

^b OF: tratamientos de oferta de forraje (alta y baja, AOvsBO). RM: Raza materna (puras: Hereford y Angus vs. F1-cruzas; PU vs. CR)

La expresión de ARNm de *GHR* (Tabla 4) en el músculo *Semitendinoso* al nacimiento tendió ($P=0,081$) a ser mayor, mientras que la expresión de ARNm de *IGF1* fue mayor ($P=0.043$), en hijos de vacas en AO que en BO (3.01 vs. 1.05 \pm 0.76 y 1.20 vs. 0.66 \pm 0.06 para *GHR* e *IGF1*, respectivamente).

El genotipo materno tendió a afectar ($P<0.086$) la expresión muscular de ARNm de *IGF1R*, *IGFBP3*, e *IGFBP5* siendo mayor en los hijos de vacas CR que PU (1.0 vs. 0.66 \pm 0.12, 1.0 vs 0.52 \pm 0.20, 0.98 vs. 0.64 \pm 0.19, respectivamente)

La expresión de ARNm de *PPARG* (Tabla 4), fue superior ($P=0.022$) en los hijos de vacas en AO que en BO (0.54 vs. 0.34 \pm 0.08). Mientras que el ARNm de *SREBF1* no fue afectado por la oferta de forraje ni el genotipo materno. Sin embargo tendió ($P=0.055$) a ser mayor en hembras que machos (0.90 vs 0.64 \pm 0.09).

Tabla 4. Efecto de la oferta de forraje en la nutrición materna durante la gestación sobre la expresión génica en músculo *Semitendinoso* de terneros al nacimiento.

Gen ¹	Tratamientos ²		Valores-P ³					
	AOPU	AOCR	BOPU	BOCR	ESM	OF	RM	OFxRM
<i>GHR</i>	4.17	1.85	0.72	1.39	1.08	0.081	0.454	0.174
<i>IGF1</i>	1.15	1.24	0.85	0.46	0.26	0.043	0.561	0.347
<i>IGF1R</i>	0.58	1.06	0.73	0.93	0.17	0.960	0.061	0.427
<i>IGFBP3</i>	0.62	1.15	0.43	0.85	0.26	0.375	0.077	0.834
<i>IGFBP5</i>	0.76	0.92	0.52	1.03	0.20	0.759	0.085	0.354
<i>PPARG</i>	0.49	0.59	0.39	0.29	0.10	0.022	0.979	0.223
<i>SREBF1</i>	0.60	0.94	0.73	0.80	0.13	0.966	0.125	0.323

¹*GHR*=receptor de hormona de crecimiento, *IGF1*= Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1, *IGF1R*= receptor para IGF, *IGFBP3*=proteína de unión tipo 3 para IGF, *IGFBP5*= Proteína de unión tipo 5 para IGF, *PPARG*= Receptor activador de proliferación de peroxisomas, *SREBF1*=Gen para la proteína de unión reguladora de esteroides. ²Tratamiento según oferta de forraje y tipo genético: Alta oferta, Puras; Alta oferta, Cruzas; Baja oferta, Puras; Baja oferta, Cruzas. ³OF: tratamientos de oferta de forraje (alta y baja, AOvsBO). RM: Raza materna (puras: Hereford y Angus vs. F1-cruzas; PU vs. CR)

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo mostraron que existió una relación entre el manejo nutricional realizado durante la gestación y el crecimiento muscular. Asimismo influyó sobre expresión de ARNm de genes del eje GH-IGF y relacionado con la adipogénesis en las crías de vacas de carne pastoreando campo natural.

Peso vivo y características del músculo esquelético de los terneros al nacimiento:

El PV de los terneros al nacimiento no se vio afectado por el tratamiento asignado, es así que la oferta de forraje no tuvo repercusiones sobre ésta característica, lo que puede estar explicado por una adaptación fisiológica y metabólica de la madre durante la gestación, que permitiera que las variaciones en los niveles nutricionales tuvieran mínimos impactos sobre la cría (Holland y Odde, 1992). De manera similar, otros autores (Martin y col., 2007) han reportado que la subnutrición materna en determinados periodos no siempre implica disminución del PV en la descendencia.

El genotipo materno tampoco influyó en el PV al nacimiento de los terneros, probablemente debido a que, si bien la heterosis observada en cruzamientos de razas británicas se ubica en un rango del 0 al 5% (Holland y Odde, 1992), éste es un valor de baja significancia como para tener repercusiones, ya que se ha observado que placentas mayores y por ende fetos más pesados se presentan a medida que la disparidad antigénica aumenta (Billington, 1964).

Independientemente del peso al nacimiento, la capacidad de crecimiento muscular queda establecida previo al nacimiento y depende del número de fibras, condicionando éstas el peso final de la masa muscular (Lefaucher y Gerrard, 2000; Du y col., 2011).

La subnutrición durante la gestación provoca retardo en el crecimiento intrauterino alterando la composición del tejido muscular (Wu y col., 2006), debido a la baja prioridad que presenta este tejido frente al desarrollo de órganos vitales (Du y col., 2010). En concordancia con lo observado por estos autores, los resultados de nuestro trabajo indican que la densidad de fibras musculares tendió a ser menor en hijos de vacas mantenidas en BO de forraje durante la gestación. Sin embargo dentro del grupo mantenido en BO fueron los hijos de vaca CR los que presentaron menor densidad de fibras, contrariamente a lo que hubiéramos esperado por efecto de la heterosis. Se ha comprobado que en ovejas gestadas la restricción nutricional de la madre provoca la disminución del número de fibras musculares en los corderos (Zu y col., 2006). De la misma manera se ha determinado en cerdos que fetos de mayor tamaño dentro de la misma camada exhibieron un mayor número de fibras musculares que sus hermanos de menor tamaño (Stickland y col., 2004).

A pesar de que se observó diferencia en la densidad de fibras musculares, el diámetro de las mismas no difirió entre grupos de terneros, contrariamente con lo reportado por Dwyer y col. (1993); Du y col. (2011) quienes determinaron que animales con PV equivalente y alto número de fibras tienen menores diámetros de

las mismas respecto a animales con menor número de fibras musculares. Por otra parte cuando se estudió la expresión de ARNm para genes vinculados al eje somatotrópico así como adipogénicos en estos animales de PV equivalente, sí se observaron diferencias en su expresión, como será expuesto a continuación.

Expresión genética en el músculo Semitendinoso:

La expresión de ARNm de *GHR* en el músculo esquelético tendió a ser mayor en los hijos de vacas en AO, contrariamente a lo obtenido por Combes y col. (1997), quienes realizando restricción nutricional en cerdos obtuvieron mayores niveles de ARNm de *GHR* en el músculo esquelético en este grupo respecto al control. A su vez Dauncey y col. (1994) observaron que dietas ricas en energía ocasionaron una menor expresión de ARNm de *GHR* en el músculo esquelético respecto al grupo de animales sin suplementar. Esta aparente contradicción entre los datos obtenidos de la bibliografía y los que se desprenden de nuestro trabajo pudo haber sido debida a que la restricción nutricional planteada en nuestro modelo experimental comprendió toda la vida fetal, mientras que en los trabajos citados se desarrolló en períodos acotados de tiempo en animales luego del nacimiento.

Como era de esperarse, ya que los niveles de IGF-I dependen de la nutrición (Clemmons y col., 1985; Philips y Kaytor, 1999), la expresión de ARNm de *IGF1* en el músculo de los terneros hijos de vacas en AO fue significativamente superior respecto a la expresión de este gen en hijos de vacas en BO. Niveles elevados de IGF-I en la madre (los cuales están directamente relacionados a los niveles de insulina y al estatus nutricional (Oliver y col., 1996)) aumentan el transporte de nutrientes a través de la placenta siendo éstos responsables del aumento de la producción de *IGF1* fetal (Stickland y col., 2004), estando asociada la menor expresión del gen de *IGF1* a fetos que presentan retardo en el crecimiento (Rhoads y col., 2000).

Como ha sido expuesto en los resultados, la expresión de ARNm de *IGFR1*, *IGFBP3* e *IGFBP5* tendió a ser mayor en los hijos de vacas CR, pudiendo este hecho deberse en parte a la posible diferencia entre el ambiente uterino de las madres según su genotipo (Hafez, 1963), sin embargo debemos tener en cuenta en este punto el genotipo propio del ternero, ya que los hijos de vacas PU son cruce y los de vacas CR son retro-cruce, lo que podría determinar un efecto que no podemos medir en las condiciones de este experimento. Además si consideramos que la expresión de *IGF1* fue mayor en hijos de vacas mantenidas en AO y que la densidad de fibras tendió a ser menor en los hijos de vacas CR en BO, podríamos pensar que la mayor expresión de *IGFR1*, *IGFBP3* e *IGFBP5* en hijos de vacas CR pudieran deberse a un intento de compensar el crecimiento del músculo comprometido por el disminuido aporte nutricional (Clemmons, 2009). Además, la expresión de ARNm de *IGFR1* en músculo esquelético es mayor en animales de menor peso al nacimiento, estimulando el crecimiento compensatorio del mismo (Micke y col., 2011).

La expresión de ARNm de *PPARG* fue superior en hijos de vacas en AO. Teniendo en cuenta que las células mesenquimales pueden dar origen a fibras musculares, adipocitos o fibroblastos (Lefaucheur y Gerrard, 2000) y que su diferenciación a adipocitos depende de la activación del *PPARG* (Fajas y col., 2001), el manejo de la nutrición materna durante la gestación estimularía a las células mesenquimales a convertirse en adipocitos aumentando así el marmoleado (Du y col., 2010).

En acuerdo con nuestros resultados; existe evidencia previa de la relación entre la expresión de *PPARG* y el estatus nutricional (McNeel y col., 2000; Houseknecht y col., 2002; Muhlhausler y col., 2007). Se ha reportado que la expresión de *PPARG* está regulada por los ácidos grasos en la dieta en cerdos (Houseknecht y col., 2002) y en ovinos, habiéndose obtenido una mayor expresión de ARNm de *PPARG* en el músculo fetal de animales suplementados (Tong y col., 2008).

Por otra parte, la expresión de *SREBP1* no se vio afectada por el plano nutricional, probablemente debido a que si bien éste fue distinto, no hubo diferencia en la composición en la dieta, siendo en ambos casos pobre en contenido lipídico, condicionando el mismo la expresión de *SREBP1* (Houseknecht y col., 2002). Sin embargo la expresión de ARNm para este gen en el músculo semitendinoso sí se vio afectada por el sexo del ternero, siendo éste el único parámetro sobre el que tuvo repercusiones el efecto sexo, resultando mayor en hembras.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el manejo nutricional de las vacas durante la gestación y el tipo genético de las mismas afectaron las características del músculo esquelético de la descendencia, pudiendo condicionar así el futuro desempeño productivo de la cría tanto en cantidad como en calidad de carne. Para profundizar en esta área de conocimiento serían necesarios estudios posteriores que contemplaran por ejemplo la posibilidad de acotar los tiempos de la restricción nutricional de las madres a períodos críticos o ventanas del desarrollo fetal para evitar la adaptación metabólica de la vaca y obtener un efecto más puro de la restricción en si misma sobre el feto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Allen R. E, Merkel R. A, Young R.B. (1979). Cellular aspects of muscle growth: Myogenic cell proliferation. *Journal of Animal Science*. 49: 115-127.
- 2) Baker, J., Liu, J.P., Robertsson, E.J., Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. 75(1): 73-82.
- 3) Bass J., Oldham J., Sharma M., Kambadur R. (1999). Growth factors controlling muscle development. *Domestic Animal Endocrinology* 17: 191-197.
- 4) Bayol S., Jones D., Goldspink G., Stickland C. (2004). The Influence of under nutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. *British Journal of Nutrition* 91: 311-399.
- 5) Baxter, R.C. (2000). Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 278:967-976.
- 6) Bernard C., Cassar-Malek I., Renand G., Hocquette J.F. (2009). Changes in muscle gene expression related to metabolism according to growth potential in Young bulls. *Meat Science* 82: 205-212.
- 7) Billington, W. O. (1964). Influence of immunological dissimilarity of mother and foetus on size of placenta in mice. *Nature* 200:317-318
- 8) Brun R.B, Kim J.B, Hu Erding, Altiook S., Spiegelman B.M. (1996). Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory cascade. *Current Opinion in Cell Biology* 8(6): 826-832.
- 9) Cardasis, A., Cooper G.W. (1975). An analysis of nuclear numbers in individual muscle fibers during differentiation and growth: A satellite cell-muscle fiber growth unit. *Journal of Experimental Zoology* 191:347-353.
- 10) 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. *Journal of Dairy Science* 92(10): 4889-4900.
- 11) Castillo G., Hauser S., Rosenfield J. K., Spiegelman B. M. (1999). Role and Regulation of PPAR γ during adipogenesis. *Journal of Animal Science* 77:9-15.

- 12) Clemmons, D.R. (1997). Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Review* 8: 45-62.
- 13) Clemmons, D.R. (2009). Role of IGF-I in skeletal muscle mass. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 20(7): 349-356.
- 14) Combes, S., Louveau I., Bonneau (1997). Moderate Food Restriction Affects Skeletal Muscle and Liver Growth Hormone Receptors Differently in Pigs. *Journal of Nutrition* 127:1944-1949.
- 15) Coolican, S.A., Samuel, D.S., Ewton, D.Z., Mc Wade, F.J., Florini, J.R. (1997). The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *Journal of Biology and Chemistry* 272(10): 6653-6662.
- 16) Dayton W.R., White M. E. (2008). Cellular and Molecular regulation of muscle growth and development in meat animals. *Journal of Animal Science* 86: 217-225.
- 17) Dauncey M.J., Burton Ka ., White P., Harrison A.P., Glimour R.S., Duchamf C., Cattaneo D. (1994). *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 8:81-88.
- 18) De Mambro V.E., Clemmons D.R., Horton L.G., Bouxsein M.L., Wood T.L., Beamer W.G., Canalis E., Rosen C.J. (2008). Gender –specific changes in bone turnover and skeletal architecture in IGFBP-2 null mice. *Endocrinology* 149: 2051-2061.
- 19) Denley, A.L., Cosgrove, J., Booker, G.W., Wallace, J.C., Forbes, B.E. (2005). Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Review* 16: 421-439.
- 20) Dervishi E., Serrano C., Joy M., Serrano M., Rodellar C., Calvo J.H., (2010). Effect of the feeding system on the fatty acid composition, expression of the $\Delta 9$ – desaturase, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha, Gamma, and Sterol Regulatory Element Binding Protein 1 genes in the semitendinous muscle of light lambs of the Rasa Aragonesa Breed. *BMC Veterinary Research* 6:40-47.
- 21) Du M., Tong J., Zhao J., Underwood K.R., Zhu M., Ford S.P., Nathanielsz P.W., (2010). Fetal Programming of Skeletal Muscle Development in Ruminant Animals. *Journal of Animal Science* 88(13): 51-60
- 22) Du M., Zhao J., Yan X., Huang Y., Nicodemus L., Yue W., McCormick R., Zhu M., (2011). Fetal muscle development, mesenchymal multipotent cell differentiation, and associated signaling pathways. *Journal of Animal Science* 89:583-590
- 23) Duan, C., Ren H., Gao S. (2010). Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors and IGF-binding proteins: Roles in skeletal muscle growth and differentiation. *General and Comparative Endocrinology* 167: 344-351.
- 24) Duan, C., Xu, Q. (2005). Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 167: 344-351.

- 25) Dwyer C.M., Fletcher J.M., Stickland N.C. (1993). Muscle cellularity and postnatal growth in the pig. *Journal of Animal Science*. 71: 3339-3343.
- 26) Espasandin, A.C., Franco, J.B., Oliveira, G., Bentancur, O., Gimeno, D., Pereyra, F., López Mazz, C., Rogberg, M. (2006) Impacto Productivo y Económico del Uso del Cruzamiento Entre las Razas Hereford y Angus en el Uruguay. XXXIV Jornadas de Buiatría. Paysandú, Uruguay p 41-51
- 27) Etherton, T.D. (2000). The biology of somatotropin in adipose tissue growth and nutrient partitioning. *Journal of Nutrition* 130:2623-2625.
- 28) Ewton D.Z., Coolivan S.A., Mohan S., Chamasek S.D, Florini J.R.(1998) Modulation Of Insulin-like factor action in L6A1 myoblast by insulina-like growth factor binding proteína (IGFBP) -4 and IGFBP-5: a dual role for Igfbp-5. *Journal of Cellular Physiology* 177: 47-57
- 29) Fajas, L., Debril, M.B., Auwerx, J. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: from adipogenesis to carcinogenesis. *Journal of Molecular Endocrinology* 27:1-9.
- 30) Fève B. (2005). Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Practice Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 19:4: 483-499.
- 31) Firth, S.M., Baxter, R.C., (2002). Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocrinology Review*. 23, 824–854.
- 32) Florini, J.R., Ewton, D.Z, Coolican, S.A. (1996). Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocrinology Review* 17(5): 481-517.
- 33) Ford, S. P., Hess, B.W., Schwoppe, M.M., Nijland, M. J., Gilbert, J. S., Vonnahme, K. A., Means, W.J., Han, H., Nathanielsz P.W., (2007). Maternal under nutrition during early to mid-gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in male offspring. *Journal of Animal Science* 85: 1285–1294.
- 34) Fowden, A.L. (1997). Comparative aspects of fetal carbohydrate metabolism. *Equine Veterinary Journal* 24: 19-25.
- 35) Funston, R. N., Larson, D.M., Vonnahme, K.A. (2010). Effects of maternal nutrition on conceptus growth and offspring performance: Implications for beef cattle production. *Journal of Animal Science* 88: E205–E215.
- 36) Graugnard, D.E., Berger, L.L., Faulkner, D.B., Loor, J.J. (2009). High-starch diets induce precocious adipogenic gene network up-regulation in longissimus lumborum of early-weaned Angus cattle. *British Journal of Nutrition* 21:1-11.
- 37) Graugnard, D. E., Piantoni, P., Bionaz, M., Berger, L.L., Faulkner, D. B., Loor J. J. (2009). Adipogenic and energy metabolism gene networks in longissimus lumborum during rapid post-weaning growth in Angus and Angus x Simmental cattle fed high-starch or low-starch diet. *BMC genomics* 10:142.

- 38) Ge, X., Yu, J., Jiang, H. (2012). Growth hormone stimulates protein synthesis in bovine skeletal muscle cells without altering insulin-like growth factor-I mRNA expression. *Journal of Animal Science* 90:1126-1133.
- 39) Greenwood, P. L., Cofe, L.M. (2007). Prenatal and preweaning growth and nutrition of cattle: long-term consequences for beef production. *Animal* 9: 1283–1296.
- 40) Griinari, J.M., Corl, B.A., Lacy, S.H., Chouinard, P.Y., Nurmela, K.V., Bauman, D.E. (2000). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 -desaturase. *Journal of Nutrition* 2000, 130:2285-2291.
- 41) Hafez, E.S. (1963). Symposium of Growth: Physio genetics of prenatal growth. *Journal of Animal Science* 22 (3): 779-791.
- 42) Haydock, K., Shaw N. (1975). The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 15: 663-670.
- 43) Herrington, J., Smit, L.S., Schwartz, J., Carter-Su, C. (2000). The role of STAT proteins in growth hormone signaling. *Oncogene* 19: 2585-2597.
- 44) Hoashi, S., Ashida, N., Ohsak, H., Utsugi, T., Sasazaki, S., Masaaki Taniguchi, M., Oyama, K., Mukai, Mannen, H. (2007). Genotype of bovine sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome* 18:880-886.
- 45) Holland, M.D., Odde, K.G. (1992). Factors affecting calf birth weight: a review. *Theriogenology* 38: 769–798.
- 46) Horton, J.D., Bashmakov, Y., Shimomura, I., Shimano, H. (1998). Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refeed mice. *Proceedings of National Academy of Science USA* 95:5987-5992.
- 47) Houseknecht, K.L., Cole, B.C, Steele, P.J. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) and its ligands: A review. *Domestic Animal Endocrinology* 22:1-23.
- 48) Hu, E., Tontonoz, P., Spiegelman, B.M. (1995). Transdifferentiation of myoblast by the adipogenic transcription factors PPARG and c/EBP α . *Proceedings of the National Academy of Science* 92: 9856-9860.
- 49) INIA, 2012c. Instituto Nacional de Carnes. Producción de carne en Uruguay. Disponible en: http://www.inac.gub.uy/innovaportal/v/3133/1/innova.net/produccion_de_carne_en_uruguay. Fecha de consulta: 15 de diciembre 2012.

- 50) INIA, 2012a. Instituto Nacional de Carnes. Resumen estadístico. Disponible en: <https://webserver.inac.gub.uy/sitiodelproductor>. Fecha de consulta: 15 de diciembre de 2012.
- 51) INIA, 2012b. Instituto Nacional de Carnes. Stock bovino. Disponible en: <http://www.inac.gub.uy/innovaportal/v/1048/1/innova.net/bovinos>. Fecha de consulta: 15 de diciembre de 2012.
- 52) James, D. A. (1967). Some effects of immunological factors on gestation in mice. *J. Reprod. Fertil.* u:265-275 .
- 53) Janhishe E. (2000). Expression and localization of IGF-binding protein mRNA in regenerating rat skeletal muscle. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 108: 747-755.
- 54) Jogie-Brahim, S., Feldman, D., Oh, Y. (2009). Unraveling insulin-like growth factor binding protein-3 actions in human disease. *Endocrinology Review* 30: 417–437.
- 55) Jones, J.I., Clemmons, D.R., (1995). Insulin-like growth-factors and their binding proteins— biological actions. *Endocrinology Review* 16: 3–34.
- 56) Keady, S. M., Kenny, D. A., Keane, M.G., Waters, S.M. (2011). Effect of sire breed and genetic merit for carcass weight on the transcriptional regulation of the somatotrophic axis in longissimus dorsi of crossbreed steers. *Journal of Animal Science*, 89: 4007-4016.
- 57) Kim, J.B., Spiegelman, B.M. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes and Development* 10: 1096-1107.
- 58) Klover, P., Hennighausen, L. (2007). Postnatal Body Growth is Dependent on the Transcription Factors Signal Transducers and Activators of Transcription 5a/b in Muscle: A Role for Autocrine/Paracrine Insulin-Like Growth Factor I. *Endocrinology* 148(4):1489-1497.
- 59) Koinsberg, I.R. (1961). Cellular differentiation in colonies derived from single cell plantings of freshly isolated chick embryo muscle cell. *Proceedings of the national academy of science of the United States of America* 47: 1868.
- 60) Lazar, M.A. (1999). PPAR γ in adipocyte differentiation. *Journal of Animal Science* 77:16-22.
- 61) Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J., Butler, A. (2001). The somatomedin hypothesis. *Endocrine Reviews* 22(1): 53-74.
- 62) Lee Y., Oh D., Lee, J., La, B., Yeo, J. (2013). Novel single nucleotide polymorphism of bovine SREBP1 gene is association with fatty acid composition and marbling score in commercial Korean cattle (Hanwoo). *Molecular Biology Reports* 40:247-254.

- 63) Lefaucheur L., Gerrard D. (2000). Muscle fiber plasticity in farm mammals. *Journal of Animal Science* 77:1-19.
- 64) Lehnert, S.A., Reverter, A., Bryne, K.A., Wang, Y.H., Nattress, G.S., Hudson, N.J., Greenwood, P.L. (2007). Genes expression studies of developing bovine longissimus muscle from two different beef cattle breeds. *BMC Developmental Biology* 7:95.
- 65) Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertsson, E.J., Estratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (IGF-1) and type 1 IGF receptor (IGF1R). *Cell* 75(1):59-72.
- 66) Long, N.M., Prado-Cooper, M.J., Krehbiel, C R., DeSilva, U., Wettemann, R.P. (2010). Effects of nutrient restriction of bovine dams during early gestation on postnatal growth, carcass and organ characteristics, and gene expression in adipose tissue and muscle. *Journal of Animal Science* 88:3252-3261.
- 67) Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R.M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839.
- 68) Martin, J.L., Vonnahme, K.A., Adams, D.C., Lardy, G.P., Funston, R.N. (2007). Effects of dam nutrition on growth and reproductive performance of heifer calves. *Journal of Animal Science* 85: 841–847.
- 69) McNeel, R.L., Mersmann, H.J. (2000) Nutritional deprivation reduces the transcripts for transcription factors and adipocyte-characteristic proteins in porcine adipocytes. *Journal of Nutrition and Biochemistry* 11:139–46.
- 70) Micke, G.C., Sullivan, T.M., Mc Millen, I.C., Gentili, S., Peny, V.E. (2011). Protein intake during gestation affects postnatal bovine skeletal muscle growth and relative expression of IGF1, IGF1R, IGF2 and IGF2R. *Molecular and Cellular Endocrinology* 22: 206-215.
- 71) Ministerio de Ganadería, agricultura y pesca. Anuario estadístico agropecuario 2011. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2011/DIEA-Anuario-2011-web.pdf>. Fecha de consulta: 17 de octubre de 2012.
- 72) Mott, G.O. (1960). Grazing pressure and the measurement of pasture production. *Proceedings of the 8th International Grassland Congress*. England, 606-611.
- 73) Muhlhausler, B.S., Duffield, J.A., McMillen, I.C. (2007) Increased Maternal Nutrition Stimulates Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ , Adiponectin, and Leptin Messenger Ribonucleic Acid Expression in Adipose Tissue before Birth. *Endocrinology* 148(2):878-885.

- 74) Mukherjee, A. (2008). Insulin like growth factor (IGF) binding protein-5 Blocks skeletal muscle differentiation by inhibiting IGF actions. *Molecular Endocrinology* 22: 206-215.
- 75) Nakae, J., Kido, Y., Accilli, D. (2001). Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-1 receptors. *Endocrine Review* 22(6): 818-835.
- 76) Nathanielsz, P.W., Poston, L., Taylor, P.D. (2007). In utero exposure to maternal obesity and diabetes: Animal models that identify and characterize implications for future health. *Clinics in Perinatology* 34: 515-526.
- 77) Ning Y., Shuller AGP., Conover CA., Pintar JE. (2008). Insulin Like growth factor (IGF)- binding protein-4 is both a positive and negative regulator of IGF activity in vivo. *Molecular Endocrinology* 22: 1213-1225.
- 78) Oksbjerg, N., Gondret, F., Vestergaard, M. (2004). Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system. *Domestic Animals Endocrinology* 27:219–240.
- 79) Oliver, M.H., Harding, J.E., Breier, B.H., Gluckman, P.D. (1996). Fetal IGF-1 e IGF-2 are regulated differently by glucose or insulin in the sheep fetus. *Reproduction Fertility and Development*. 8: 167-172.
- 80) Osgerby, J.C., Wathes, D.C, Howard, D., Gadd, T.S. (2002). The effect of maternal under nutrition on ovine fetal growth. *Journal of Endocrinology* 173: 131-141.
- 81) Pell, J.M., Saunders, J.C., Gilmour, R.S. (1993). Differential regulation of transcription initiation from insulin-like growth factor-I (IGF-I) leader exons and ovine tissue IGF-I expression in response to changed growth hormone and nutritional status in sheep. *Endocrinology* 132: 1797-1807.
- 82) Philippou, A., Maridaki, M., Halapas, A., Koutsilieris, M. (2007). The Role of the insulin-like Growth Factor 1 (IGF₁) in Skeletal muscle Physiology. *In Vivo* 21: 45-54.
- 83) Pieter, H., Houba, J., Te Pas, M.F. (2004). The Muscle Regulatory Factors Gene Family in Relation to Meat Production. *Muscle Development of Livestock Animals. Physiology, Genetics and Meat Quality. (Cambridge)- CABI* 10:201-223.
- 84) Quintans, G., Banchemo, G., Carriquiry, M., Baldi, F. (2008). Condición corporal y restricción del amamantamiento en vacas de carne. II. Efecto de la producción de leche y crecimiento de terneros. *Memorias XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay*. 196-199
- 85) Redmer, D.A., Wallace, M., Reynolds, I.P. (2004). Effects of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development. *Domestic Animals Endocrinology* 27:199-217.

- 86) Russell R.G., Oteruelo F.T., (1981). An ultra structural study of the differentiation of skeletal muscle in the bovine fetus. *Anatomy Embryology (Berl)* 162:403-417.
- 87) Sollenberger, L., Moore, J., Allen, V., Pedreira, C. (2005). Reporting herbage allowance in grazing experiments. *Crop Science* 45: 896–900.
- 88) Stickland, N.C., Bayol, S., Ashton, C., Rehfeldt, C. (2004). Manipulation of Muscle Fibre Number During Prenatal Development. *Muscle Development of Livestock Animals. Physiology, Genetics and Meat Quality. (Cambridge)- CABI* 3: 69-82.
- 89) Thissen, J. P., Ketelslegers, J.M., Underwood, L.E. (1994). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocrine Reviews* 15(1): 80-101.
- 90) Tong, J., Zhu, M.J., Underwood, K.R., Willess, B., Ford, S.P., Du, M. (2008). AMP-activated protein kinase and adipogenesis in sheep fetal skeletal muscle and 3T3-L1 cells. *Journal of Animal Science* 86: 1296-1305.
- 91) Tontonoz, P., Kim, J.B., Graves, R.A., Spiegelman, B.M. (1993). ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determinations and differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 13: 4753-4759.
- 92) Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I., Spiegelman, B.M. (1994). mPPARG2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes and Development* 8: 1224-1234.
- 93) Vann, R.C., Althen, T.G., Solomon, M.B., Eastridge, J.S., Paroczay, E.W., Veenhuizen, J.J. (2001). Recombinant bovine somatotropin (rbST) increases size and proportion of fast-glycolytic muscle fibers in semitendinous muscle of creep-fed steers. *Journal of Animal Science* 79: 108-114.
- 94) Vestergaard, M., Purup, S., Frystyk, J., Lovendahl, P., Sorensen, M.T., Riis, P.M., Flint, D.J., Sejrsen, K. (2003). Effects of growth hormone and feeding level on endocrine measurements, hormone receptors, muscle growth and performance of prepuberal heifers. *Journal of Animal Science* 81:2189-2198.
- 95) Vizcarra, J.A., Ibañez, W., Orcasberro, R. (1986). Repetibilidad y reproductibilidad de dos escalas para estimar la condición corporal de vacas Hereford. *Investigaciones Agronómicas* 7 (1):45-47.
- 96) Wallace, J.M., Da Silva, P., Aitken, R.P., Cruickshank, M.A. (1997). Maternal endocrine status in relation to pregnancy outcome in rapidly growing adolescents sheeps. *Journal of Endocrinology* 155 (2): 359-368.
- 97) Wallace, J.M, Bourke, D., Da Silva, P., Aitken, R.P. (2001). Nutrient partitioning during adolescent pregnancy. *Reproduction*, 122(3): 347-357.
- 98) Wang, Y., Eleswarapu, S., Beal, W. E., Swecker, W. E., Jiang H. (2003).

Reduced serum insulin growth factor (IGF) I is associated with reduced liver IGF-I mRNA and liver growth hormone receptor mRNA in food deprived cattle. *The Journal of Nutrition* 95: 2555.

- 99) Wang, Y., Bower, N. I., Reverter, A., Tan, S.H., De Jager, N., Wang, R., McWilliam, S.M., Café, L.M., Greenwood, P.L., Lehnert, S.A. (2009). Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. *Journal of Animal Science* 87:119-130.
- 100) Wang, Y., Jiang, H. (2005). Identification of a distal STAT5-binding DNA region that may mediate growth hormone regulation of Insulin-like growth factor-I gene expression. *Journal of Biology and Chemistry* 280: 10955-10963.
- 101) Waters, S.M., Kelly, J.P., O'Boyle, P., Moloney, A.P., Kenny, D.A. (2009) Effect of level and duration of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on the transcriptional regulation of delta 9- desaturase in muscle of beef cattle. *Journal of Animal Science* 87:244-252
- 102) Wood, A.W., Duan, C., Bern, A.H. (2005). Insulin-Like growth factor signaling in fish. *International Review of Cytology* 243: 0074-7596.
- 103) Wood TIL., Rogler LE., Cziche ME., Shuller AGP., Pintor JE. (2000). Selective alterations in organ sizes in mice with a targeted disruption of the insulin-like growth factor-binding protein-2 gene. *Molecular Endocrinology* 14:1472-1482
- 104) Wu, G., Bazer, F.W., Wallace, J.M., Spencer, T.E. (2006). Board-invited review: intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *Journal of Animal Science* 84: 2316–2337.
- 105) Yamada, P.M., Lee, K.W. (2009). Perspectives in mammalian IGFBP-3 biology: local vs. systemic action. *American Journal of Physiology.-Cellular Physiology* 296: C954–C976.
- 106) Zhu, M.J., Ford S.P., Means J.W, Hess B.W., Nathanielsz P.W., Du, M. (2006). Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *Journal of Physiology* 575:241–250.

ANEXO 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 mediante observación con microscopio óptico) como genéticos relacionados al eje GH-IGF mediante realización de PCR en tiempo real.

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 desinfectado (se mantendrá en una bandeja de acero inoxidable con clorhexidina) 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.
- Etanol 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 posterior 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.
- Antisepsia del área con etanol 70% y yodo mediante torundas en tres pasajes alternados.
- Inyección de 4 ml de Lidocaína al 2% percutánea en abanico y en profundidad en la zona a incidir. Luego esperar aproximadamente 5 min. para que el anestésico haga efecto.

Obtención de la muestra:

Materiales:

- Mango de bisturí No. 3 o 4 y hojas intercambiables rectas acordes al mismo.
- Pinza (dientes de ratón)
- Gotita autoadhesiva.
- Etanol 70% e Yodopovidona.
- Torundas.
- Antimiásico en spray (Baterplata o similar).

Técnica:

- Realizar una incisión de 4 cm aproximadamente, y longitudinalmente al músculo, con bisturí en la zona posterior del músculo semitendinoso a 6 cm. de la tuberosidad isquiática y 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 2 g.
- Realizar hemostasia con torundas mediante compresión para evitar el acúmulo de sangre en la herida.
- Se procede a cerrar la herida con la aplicación de gotita autoadhesiva (cianometacrilato) y se desinfecta con yodóforo (mediante torundas) para luego aplicar un antimiasmico cicatrizante (baterplata o similar) en spray a no menos de 15 cm 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.
- Solución bufferada de paraformaldehído al 4%.
- 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 (1x1 cm aproximadamente) 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 5 ml con formol bufferado al 4%. La 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.

ANEXO 2:

PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE LAS MUESTRAS: PROTOCOLO

En primer lugar deben sacarse las muestras de los recipientes con formol y realizar un corte con hoja de afeitar de unos 5 mm de espesor de las mismas. Debe tenerse en cuenta que es deseable obtener un trozo con la mayor superficie de corte posible, siempre que este se realice de manera transversal a la dirección de las fibras. En este punto es importante utilizar guantes para manejar las muestras, así como pinzas para su correcta manipulación.

Una vez obtenido el corte se procede a colocarlo en un cassette identificado con lápiz (es de gran importancia que se use lápiz tanto para identificar los cassetes como para escribir en las planillas ya que no se corre ni se borra durante el procesamiento).

Luego que las muestras están todas en sus respectivos cassetes son colocadas en un frasco o recipiente plástico destapado y dejadas bajo la canilla abierta durante 24 h para su lavado, retirando así el formol de las mismas evitando residuos como pigmentos fenólicos que impiden una buena coloración posterior.

Posteriormente se procede al deshidratado de las muestras (dentro de los cassetes) retirándose así el agua de las mismas y sustituyéndola paulatinamente con alcohol etílico.

Se realizan tres baños en etanol. El primero en etanol 70%, consiguiendo la concentración del mismo con una mezcla de alcohol comercial y agua hasta que el alcoholímetro marque la concentración deseada. En este punto se puede detener el procesamiento hasta que se desee reanudarlo o bien hacer un baño de 40 min. El mismo se realiza en un frasco de vidrio con tapa.

Luego pasan a otro frasco con etanol 95% donde permanecerán 40 min. Una vez transcurrido este tiempo el etanol es retirado del frasco y vuelto a poner en su recipiente y el frasco de las muestras es rellenado con etanol 100%, donde permanecerán una hora.

Una vez culminado el último baño en etanol, se retira el mismo del frasco y con ayuda de un embudo se lo coloca nuevamente en su recipiente y el frasco con los cassettes es rellenado con cloroformo.

Parafinado:

Para retirar los cassettes (3 en cada oportunidad) del frasco con cloroformo, se debe trabajar manteniendo ciertas normas de seguridad, como ser el uso de guantes, la manipulación de las muestras con pinzas y la realización de la misma bajo una campana de bioseguridad.

Previamente calentar en la estufa parafina en los recipientes para las muestras (3 series de 3 recipientes colocados en filas) y parafina limpia para formar los bloques en un frasco aparte. Dejar en la estufa además una pinza para manipular las muestras de un baño de parafina al siguiente, de tal forma que al estar caliente la parafina no se pegue (tener la precaución de colocarle leuco en la porción de la pinza a manipular para evitar quemaduras).

En un frasco aparte mantener calientes en parafina cassettes necesarios para formar los bloques posteriormente.

Sacar las primeras 3 muestras y colocarlas ordenadas en la primer línea de 3 recipientes de parafina. Dejarlas allí 20 min. Transcurridos los 20 min cambiar las muestras de la primer línea de recipientes con parafina a la segunda y colocar en los primeros otras 3 muestras. Nuevamente esperar 20 min.

Luego de transcurrido este tiempo cambiar las muestras de la segunda hilera a la tercera, las primeras a la segunda y en la primer línea colocar 3 muestras nuevas. Repetir estos pasos cada 20 min.

Una vez que las muestras han pasado por los 3 baños de 20 min cada uno, colocar parafina líquida en recipientes separados de acero inoxidable (apoyados sobre placas de vidrio debidamente identificadas) hasta llenar el molde, luego tomar la muestra con la pinza que se encontraba en la estufa y colocarla en el molde con la cara de corte más grande hacia abajo y colocarles por encima solo la parte más grande del cassette (de los que se encontraban en el frasco con parafina caliente) debiendo identificarlo.

Se coloca parafina limpia sobre la muestra hasta cubrir el borde del recipiente. Una vez que se solidificó la parafina se desmoldan los bloques utilizando un cuchillo, haciendo presión sobre los bordes de los moldes metálicos.

Preparación de las láminas:

Desengrasado: se sumergen las láminas en alcohol-éter y se dejan allí por 5 min. Trabajar bajo la campana sacando las láminas con una pinza y limpiándolas de a una con un trapo limpio.

Cargar las láminas en zig-zag en cajas de vidrio o plástico sin fondo ranuradas.

Pasar por 4 baños:

El primero de 22 seg en una mezcla de acetona con silano (1 ml de silano cada 50 ml de acetona comercial)

El segundo baño es con acetona, sumergiéndose y retirándose inmediatamente.

2 baños en agua destilada iguales que el anterior.

Dejar secar al menos por 24 h antes de usar.

ANEXO 3:

PROTOCOLO COLORACION: HEMATOXILINA- EOSINA

Batería de hematoxilina-eosina:

Xilol (desparafinado y montaje), etanol 70%, 95%, y 100% (des parafinado y montaje), colorantes (hematoxilina y eosina).

Colocar las láminas en un frasco de Coplin haciendo zig- zag. El zig-zag es la manera de aprovechar todas las ranuras del Coplin. Armar la batería, es práctico armarla en forma de u invertida quedando colocado de un lado el xilol y etanoles de desparafinar, al medio, los colorantes hematoxilina y eosina, en ese orden, y del otro lado los etanoles y xilol de montar respectivamente.

Consideraciones:

Para esta técnica se trabaja con 4 embudos, 2 grandes y dos pequeños. Los 2 primeros exclusivos para etanol y xilol respectivamente. Mientras que los 2 últimos son destinados para los colorantes.

Para evitar que las láminas se sequen, los pasajes entre un baño y otro deben realizarse lo más rápido posible. Para disminuir el arrastre de líquido entre pasajes se debe escurrir la caja sobre un paño.

Tiempos:

Nota: los tiempos de la deshidratación e hidratación son los mínimos que se deben cumplir. En los colorantes los tiempos cambian con el uso, y se modifican periódicamente. Los tiempos en este protocolo son para la batería de coloración calibrada en este momento.

- | | | |
|------------------|---------|-----------------|
| 1- Xilol | 10 min. | (Desparafinado) |
| 2- OH 100° | 1 min | |

- 3- OH 95° 1 min Hidratación
- 4- OH 70° 1 min
- 5- H2O..... 30 seg (tiempo mínimo).
- 6- Hematoxilina.....20 seg
- 7- Virado en agua.....20 seg (mínimo el mismo tiempo de hematoxilina tinción)
- 8- Eosina..... 15 seg
- 9- Lavado en agua (solo enjuagar)

- 10- OH 70° 1 min
- 11-OH 95° 1 min Deshidratación
- 12- OH 100° 1 min
- 13- Xilol..... 10 min (Fijación)

14- Montaje: se retiran los portas del xilol y se secan en su superficie inferior (la cara opuesta a la que se encuentran los cortes). Se dejan caer unas gotas de medio de montaje (cemento sintético similar al Bálsamo de Canadá) y se coloca a 45° el cubreobjetos dejándolo caer lentamente. Una vez sobre el portaobjetos deben retirarse todas las burbujas de aire haciendo presión sobre el cubreobjetos para evitar el deterioro del tejido. Estos pasos deben realizarse en el menor tiempo posible para evitar la desecación de la muestra y la evaporación del xilol que dificulta el pegado.

Al volcar el xilol de montar en el Coplin debe quedar claro, transparente, si queda de un aspecto lechoso, significa que no quedó bien deshidratado, en este caso se puede utilizar unos minutos de estufa.

Nota: aunque es preferible que la técnica se haga de corrido, en los puntos 1, 5, 7 y 13 se puede detener.

