

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**SUPLEMENTACIÓN DURANTE EL ÚLTIMO MES DE GESTACIÓN EN  
VACAS DE CRÍA: EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO Y ADIPOGÉNESIS  
MUSCULAR EN TERNEROS AL DESTETE**

**por**

**Marcos GARCÍA PINTOS SPALLA**

**Federico PEREYRA MONTANS**

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

**MONTEVIDEO**

**URUGUAY**

**2012**

Tesis aprobada por:

Director: -----

Ing. Agr. (PhD) Mariana Carriquiry Fossemale

-----

Dra M. V. (PhD) Raquel Perez Clariget

-----

Dra M. V. (PhD) Carolina Viñoles Gil

Fecha: 28 de junio de 2012

Autor: -----

Marcos García Pintos Spalla

-----

Federico Pereyra Montans

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestras familias por su apoyo incondicional desde el inicio de nuestras carreras.

A nuestra tutora Ing. Agr. (PhD) Mariana Carriquiry por su constante estímulo para nuestro crecimiento profesional y personal. Además, al equipo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología Animal: Dra M. V. Verónica Gutierrez, Ing. Agr. (MSc) Antonia Scarsi, Paula Machado y Dr M. V. Alberto Casal quienes colaboraron con nosotros en el presente trabajo.

A Lic (MSc) Jimena Laporta por su constante apoyo en su lugar de co-autora e Ing. Agr. (MSc) Ana Laura Astessiano por su contante colaboración desde los comienzos de este trabajo. Ambas nos enseñaron y nos acompañaron en este trabajo tanto desde el punto de vista formativo como humano.

Al Ing. Agr. Juan Andrés Pirelli por el aporte y ayuda de búsqueda de información para este trabajo.

A todos los funcionarios de INIA 33 unidad Palo a Pique que nos dieron su apoyo durante el tiempo compartido.

A las fuentes de financiación: 1. Proyecto INIA-FPTA#262. 2 Programa de Apoyo a la Realización de Proyectos de Investigación para Estudiantes Universitarios. Comisión Sectorial de Investigaciones Científicas (CSIC), UdelaR.

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	4
2.1 DESARROLLO MUSCULAR.....	4
2.2 ADIPOGÉNESIS INTRAMUSCULAR.....	8
2.3 REGULACION DEL DESARROLLO MUSCULAR.....	11
2.3.1 <u>Eje Somatotrofico</u> .....	11
2.3.2 <u>Miostatina y TGF-β</u> .....	14
2.3.3 <u>Esteroides anabólicos</u> .....	15
2.4 REGULACIÓN DE LA ADIPOGÉNESIS.....	15
2.5 HIPOTESIS.....	18
3 <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	19
3.1 LOCALIZACIÓN Y PERÍODO EXPERIMENTAL.....	19
3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL. ANIMALES Y TRATAMIENTO.....	19
3.3 DETERMINACIONES.....	20
3.3.1 <u>Determinaciones hormonales</u> .....	20
3.3.2 <u>Determinaciones histológicas</u> .....	20
3.3.3 <u>Aislamiento del ARN total y síntesis de ADNc</u> .....	21

3.3.4	<u>PCR en tiempo real</u> .....	22
3.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	24
4.	<u>RESULTADOS</u> .....	25
4.1	PESO VIVO.....	25
4.2	CONCENTRACIONES DE INSULINA E IGF-I.....	25
4.3	NÚMERO Y TAMAÑO DE FIBRAS MUSCULARES.....	25
4.4	EXPRESION GENICA EN EL MÚSCULO <i>SEMITENDINOSO</i> .....	26
5.	<u>DISCUSIÓN</u> .....	28
6.	<u>CONCLUSIONES</u> .....	33
7.	<u>RESUMEN</u> .....	34
8.	<u>SUMMARY</u> .....	35
9.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	36
10.	<u>ANEXOS</u> .....	57

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.		Página
1.	Composición química del campo nativo y suplemento utilizado	20
2.	Primers usados para la cuantificación de los genes de interés y el control endógeno mediante PCR en tiempo real.....	23
3.	Efecto de la suplementación de las madres durante el último mes de gestación sobre las concentraciones de IGF-I e insulina en plasma de los terneros al destete	25
4.	Efecto de la suplementación de las madres durante el último mes de gestación sobre el número y diámetro de la fibra del músculo <i>Semitendinoso</i> de los terneros al destete	26
5.	Efecto de la suplementación de las madres durante el último mes de gestación sobre la expresión génica en músculo <i>Semitendinoso</i> de terneros al destete.	27
Figura No.		
1.	Acontecimientos básicos de la miogenesis	5
2.	Relación entre el diámetro y el número de fibras del músculo <i>Semitendinoso</i> en ganado Holstein Friesian .....	5

3. Efectos de la nutrición fetal en el desarrollo muscular y adipogénesis 7
  
4. Músculo de cerdo con depósito adiposo: A= grasa subcutánea, B= grasa intermuscular que rodea el tejido muscular, C= grasa intramuscular entre las fibras del tejido muscular 9
  
5. Calidad de ARN total (gel 1% agarosa) extraído sobre músculo *Semitendinoso*. 22
  
6. Expresión del ARN mensajero de HPRT (control endógeno) según tratamiento, expresado en número de moléculas de HPRT... 24

## 1. INTRODUCCION

Actualmente la carne vacuna representa el 6% del PBI y un 22% de las exportaciones totales del Uruguay (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2010), posibilitando a pesar de su limitada escala, posicionarse en el mercado como el séptimo exportador de carne bovina. La superficie dedicada exclusivamente a la ganadería representa el 59,6% de la superficie total del país, la cual asciende a 82,4% cuando también se le considera asociada a otros rubros, (INIA, 2008). En los últimos años ha habido un crecimiento sostenido del stock bovino, el cual se estabilizó en 12 millones de cabezas. La producción de carne vacuna (e.j: faena, exportaciones en pie, diferencias de inventario, etc) ha mostrado un crecimiento del 67% en los últimos 15 años, siendo este incremento mayor para el número de cabezas faenadas que para los kilos en pie, como consecuencia de la composición de la faena, con una mayor proporción de animales jóvenes y de hembras en el total de animales faenados (INIA, 2008).

En Uruguay, el proceso de cría vacuna se realiza casi completamente sobre campo natural. El entore se realiza mayoritariamente desde mediados de diciembre a finales de febrero, determinando que un porcentaje elevado de vacas se encuentre en gestación avanzada (último tercio) durante el invierno, cuando la disponibilidad y calidad de forraje del campo natural es baja (Berreta et al., 2000), y los requerimientos nutricionales de las vacas gestantes son mayores (25 a 30% mayores a los de una vaca seca, NRC, 2000). Esto determina un período de balance energético negativo en el cual la vaca debe movilizar sus reservas corporales para satisfacer sus necesidades de mantenimiento y gestación (Orcasberro, 1991). En la actualidad esto podría ser peor aún si se tiene en cuenta que el aumento de las prácticas de forestación y agricultura ha provocado una mayor competencia entre rubros, desplazando paulatinamente a la ganadería a zonas marginales de producción y teniendo como consecuencia una elevada carga animal por hectárea (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2010).

La nutrición materna durante la gestación puede “programar el desarrollo” del ternero y afectar su comportamiento productivo futuro. El concepto de programación del desarrollo implica que las alteraciones durante las etapas críticas del desarrollo prenatal o posnatal puede tener impacto a largo plazo sobre el crecimiento y la función de un adulto (Caton y Hess, 2010). El principal objetivo de la cría de ganado de carne es su músculo esquelético. Las fibras del músculo esquelético se forman antes de nacer (hiperplasia), durante la etapa fetal. Luego del parto, el músculo esquelético crece por hipertrofia, es decir, aumento del diámetro en las fibras existentes (Hawke y Garry, 2001). Por lo tanto, restricciones nutricionales durante la gestación podrían provocar una disminución permanente en el número de fibras musculares reduciendo la masa muscular y afectando negativamente el rendimiento de los animales en un futuro (Du et al., 2009). De esta manera se estaría comprometiendo el objetivo que solicita la industria



cárnica de lograr pesos de carcasa mínimos de 230-240 kg a edades que no superen los treinta meses de edad.

Por otra parte, existe una sensibilización de los consumidores a nivel mundial con respecto a la calidad de los alimentos, preocupados por la necesidad de que los mismos a adquirir, no resulten perjudiciales para su salud, siendo producidos en sistemas amigables con el ambiente de forma sustentable (INIA, 2008). De esta forma, se creó el programa “Carne Natural Certificada del Uruguay” (INIA, 2008) la cual resulta de un proceso de producción basado en pasturas, a cielo abierto, ofreciendo garantías de producción y trazabilidad. Sistemas de alimentación basados en forrajes, permiten mejorar el perfil de ácidos grasos depositados en la carne, debido a la mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados presentes en el forraje en relación a los granos de cereales, generando así, mayor proporción de estos en el tejido adiposo depositado. Particularmente, la carne producida en base a forraje presenta también una proporción mayor de ácidos linolénicos conjugados (CLA), en su composición, de acción anticarcinogénica u antilipogénica (Griguera et al., 2003). Otros autores también destacan una mayor relación de ácidos grasos omega-3/omega-6 en carnes producidas en sistemas pastoriles con atributos positivos para la salud humana (Mann et al. 2003, Ponnampalam et al. 2006).

Sin embargo, la deposición de grasa intramuscular (marmoleo), en carnes producidas en base a forraje es reducida, afectando las características de calidad, tales como la terneza, jugosidad y sabor (Hovenier et al. 1993, Verbeke et al. 1999). El marmoleo esta dado por la formación de adipocitos que acumulan grasa intramuscular durante el crecimiento posnatal, formando vetas de grasa. Debido a que el ganado alimentado con pasto, no es alimentado con una dieta a base de cereales durante el "engorde" la cual induce a la hipertrofia del adipocito, es poco probable que el tamaño de éstos se incremente de forma notoria durante la fase de terminación. Por lo tanto, el manejo nutricional de la madre durante la gestación con el fin de aumentar la adipogénesis intramuscular en el feto, es una alternativa plausible para mejorar el marmoleo de ganado vacuno alimentado en un futuro a base de pasturas (Du et al., 2009).

Es así, que los períodos de carencia de nutrientes maternos durante la gestación en momentos determinados del desarrollo del músculo esquelético, podría reducir el crecimiento de la masa muscular y generar cambios en el marmoleo del ternero, comprometiendo así el desempeño futuro del animal (Funston et al., 2010). La suplementación preparto podría ser una posible estrategia para mejorar el plano nutricional durante la etapa fetal y aumentar así el comportamiento productivo futuro del ternero. Teniendo en cuenta la importancia a nivel nacional que implica la producción de carne basada en sistemas pastoriles y las posibilidades de generar a nivel país productos certificados, parecería fundamental la generación de nuevos conocimientos que permitan

incrementar la eficiencia global en la utilización de campo nativo, obteniendo productos de alta calidad.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DESARROLLO MUSCULAR

El término “carne” se define como el tejido del músculo esquelético después del sacrificio del animal (Houba y te Pas, 2004). El músculo esquelético se compone de diferentes tipos de células, las fibras musculares, los adipocitos, las células del tejido conectivo, endoteliales y del tejido nervioso. La fibra es la unidad básica del músculo esquelético representando entre 75 a 90% de la masa total del músculo (Hegarty, 1971), siendo la red de células nerviosas, a pesar de cumplir funciones esenciales, de menor proporción en la masa muscular total (Rehfeldt et al., 1999). Los músculos crecen por alargamiento y engrosamiento de las fibras individuales (Johnston et al., 1975). Es así que el número de fibras musculares y el tamaño de la fibra muscular determinan la masa muscular (Houba y te Pas, 2004).

El desarrollo embrionario del músculo esquelético ocurre mediante un proceso denominado miogénesis (desarrollo del músculo), a partir de las denominadas células madre mesenquimales. Durante la miogénesis las fibras musculares se diferencian a partir de dos poblaciones distintas en un proceso conocido como hiperplasia. Fibras primarias, que se forman durante las etapas iniciales de la fusión de mioblastos, en la denominada primera ola de diferenciación y secundarias que se originan en la segunda ola de proliferación y diferenciación de mioblastos (Rehfeldt et al., 2004, Figura 1). Estas últimas representan la mayoría de las fibras musculares esqueléticas (Beermann et al., 1978) y su formación se solapa parcialmente con la formación de adipocitos y fibroblastos intramusculares (Du et al., 2009).

Se ha sugerido, que el desarrollo primario de la fibra muscular depende fundamentalmente del genotipo del animal (Houba y te Pas, 2004). En cambio, el desarrollo secundario muscular puede estar influenciado por factores ambientales, tales como la nutrición (Dwyer y Stickland 1991, Rehfeldt et al. 1993, Dwyer et al. 1994).

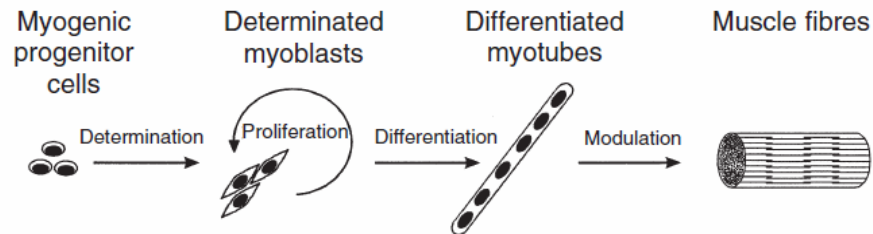


Figura 1 Acontecimientos básicos de la miogénesis (Rehfeldt et al., 2004).

En la mayoría de los mamíferos, el número de fibras del músculo esquelético se determina antes de nacer, por lo que el número total de fibras musculares, que constituyen un músculo determinado, normalmente es fijado en el momento del nacimiento. Luego del parto, los músculos esqueléticos crecen por hipertrofia, es decir, aumentan el diámetro de las fibras existentes (Hawke y Garry, 2001, Figura 2). En este sentido, Joubert (1956) afirmó que desde el nacimiento hasta la madurez del animal el diámetro de la fibra aumenta un 41%, no de forma lineal con la edad, sino de forma similar a la curva de crecimiento y su relación al peso corporal.

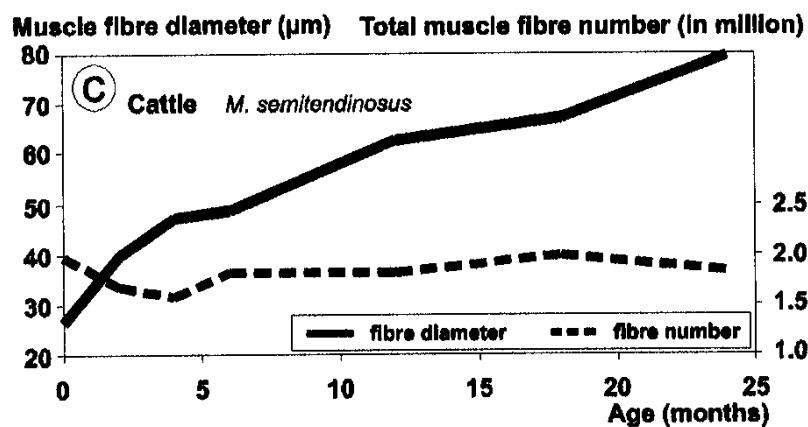


Figura 2. Relación entre el diámetro y el número de fibras del músculo *Semitendinoso* en ganado Holstein Friesian (Wegner et al., citados por Rehfeldt et al., 1999).

Existe también, otra población de mioblastos denominadas células satélite, las cuales no forman fibras, pero rodean las miofibras. Estas son capaces de dividirse y ser fuente de mionúcleos (ADN externo) durante la hipertrofia posnatal al fusionarse con las fibras musculares existentes, las cuales son incapaces de dividirse (Moss y Leblond 1971, Champion 1984). Por lo tanto es determinante la proliferación de dichas células, que incorporen nuevos núcleos en el proceso de crecimiento posnatal.

La hipertrofia de la fibra muscular depende en gran medida del número total de fibras musculares dentro de un músculo. Siendo la tasa de crecimiento posnatal de la fibra muscular individual inferior cuando existe un número alto de fibras y superior cuando existen un número bajo de fibras musculares (Figura 2). Por tanto, el tamaño de las fibras musculares esta correlacionado inversamente con el número de fibras musculares (Rehfeldt et al., 1999). Una explicación de este claro antagonismo entre el número de fibras musculares y su tamaño, sería debido a la distribución uniforme de la energía nutricional entre todas las fibras. Sin embargo, el coeficiente de correlación entre el número de fibras y su diámetro no es igual a uno, lo que significa que algunos animales presentan una alta hipertrofia a pesar de su alto número de fibras musculares (Rehfeldt et al., 1999).

Como se mencionó anteriormente, la etapa fetal es crítica para el desarrollo muscular, ya que no hay aumento neto del número de fibras musculares después del nacimiento (Stickland 1978, Zhu et al. 2004). Sumado a esto, la prioridad en la partición de nutrientes durante el desarrollo fetal para el músculo es baja en comparación con órganos como el cerebro, el corazón y el hígado. Por lo tanto el desarrollo muscular es vulnerable a perturbaciones, como la deficiencia de nutrientes durante la etapa fetal (Zhu et al., 2004). Particularmente una disminución en el número de fibras musculares debido a la programación fetal permanente, reduciría la masa muscular, afectando negativamente el rendimiento futuro de los animales (Du et al., 2009).

Según Du et al. (2009) existe un efecto diferencial de la nutrición materna según la etapa de la gestación, siendo el número total de fibras o el tamaño de estas modificado como consecuencia de la etapa de gestación afectada (Figura 3). Durante etapas muy tempranas de la gestación la nutrición parecería tener poco efecto sobre el desarrollo fetal de los músculos esqueléticos ya que en bovinos las fibras musculares primarias se forman los primeros dos meses luego de la concepción (Russell y Oteruelo, 1981) y estas, como se mencionó anteriormente, son de menor importancia con respecto al número total que componen la masa muscular. En cambio la mayoría de las fibras musculares se forman entre los dos a siete u ocho meses de gestación (mediados de la gestación) en el ganado bovino (Russell y Oteruelo, 1981). Por lo tanto una reducción en la formación, tendría efectos negativos irreversibles en el ternero (Stannard y Johnson, 2004).

Zhu et al. (2006) reportaron que restricciones de nutrientes al 50% de los requerimientos (NRC, 1985) a partir del día 28 hasta el día 78 de gestación en ovinos redujo el número total de fibras musculares secundarias. Posteriormente estos corderos con 8 meses de edad presentaron también menor número de fibras musculares, demostrando así los efectos a largo plazo causados por la nutrición fetal. Experimentos en cerdos han demostrado que tanto una restricción de alimento en la primera mitad o durante toda la gestación, produce la misma reducción de un 25% en el número de fibras

(Dwyer et al., 1995). Resultados similares fueron encontrados por Ward y Stickland. (1991) en cobayos. Por lo tanto una deficiencia de nutrientes a mediados de la gestación reduciría el número de fibras musculares y la masa muscular, afectando negativamente el desempeño del crecimiento y el desarrollo de las crías (Du et al., 2009).

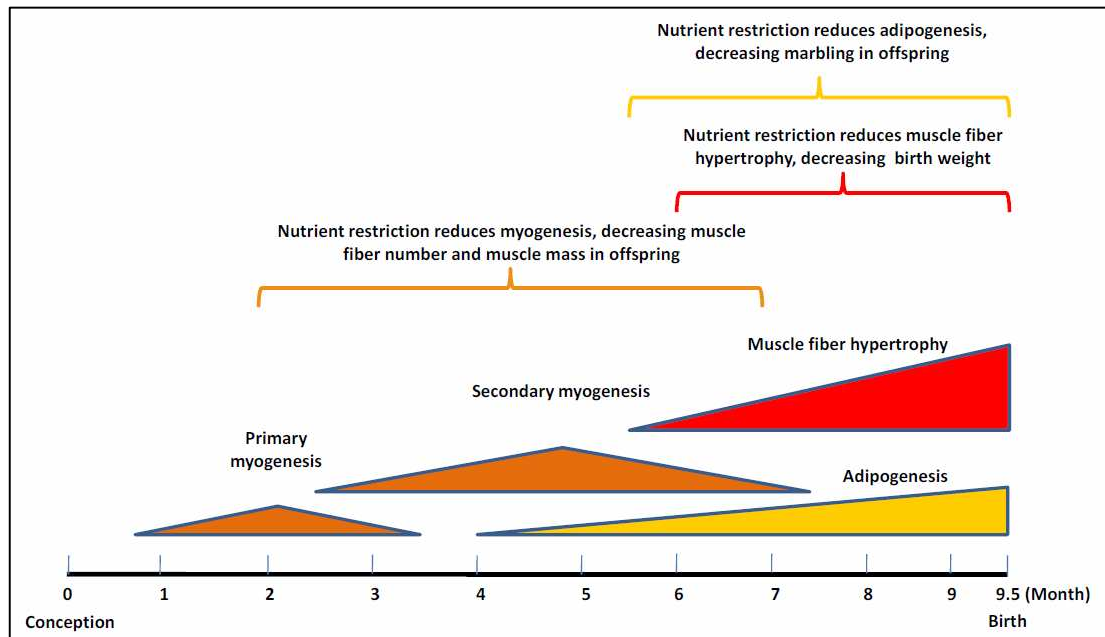


Figura 3. Efectos de la nutrición fetal en el desarrollo muscular y adipogénesis (Du et al., 2009).

De forma similar al número de fibras musculares, pero en diferente período, opera el tamaño de estas ante variaciones de la nutrición materna. El músculo esquelético madura durante la gestación tardía (aproximadamente a partir del día 105 de gestación en ovinos y 210 en vacunos). Restricciones de nutrientes posteriores a esta etapa no tienen impacto notorio en el número de fibras musculares (Du et al., 2009) pero si reducirían el tamaño de la fibra (Greenwood et al., 1999), Mc Coard et al. (2000) al comparar preñeces simples y dobles en ovejas, no encontraron limitaciones en la hiperplasia muscular pero si en su hipertrofia.

Consecuentemente experimentos en ovinos demostraron que el peso al nacimiento de corderos hijos de ovejas suplementadas durante 50 días preparto con 0,5 kg/día de avena no fue diferente al grupo testigo (sin suplementación), pero la tasa de crecimiento hasta el destete fue 13,5% superior en corderos hijos de madres suplementadas (+ 4 kg) (Becker et al., 2000). Una disminución en la nutrición materna al final de la gestación podría reducir el peso del ternero recién nacido (Freetly et al., 2000), probablemente como resultado de la reducción del tamaño de las fibras musculares.

Se ha reportado que la desnutrición posnatal no alteró el número de fibras musculares en ratas (Schadereit et al., 1995), en cerdos (Stickland et al., 1975) y en ganado bovino (Osterc, 1974). Sin embargo, ante una desnutrición severa durante la lactancia en roedores, disminuyó el número de fibras musculares (Layman et al. 1981, Bedi et al. 1982). Probablemente en este caso, el alargamiento de los miofibrilos existentes que conduce a un aumento del número de fibras durante el crecimiento posnatal temprano, no se podría completar cuando los animales están desnutridos durante la vida posnatal temprana. Parecería ser importante, si el período de lactancia se incluye en el período restrictivo mencionado.

En cambio, la malnutrición durante el crecimiento posnatal conduce a la disminución del diámetro de las fibras musculares en roedores (Rehfeldt et al., 1991), cerdos (Stickland et al., 1975), ovinos (Joubert, 1956), bovinos (Beerwinkle et al., 1979). Afectando exclusivamente a la hipertrofia de la misma por medio de la reducción nuclear.

## 2.2 ADIPOGÉNESIS INTRAMUSCULAR

En general, hay tres grandes depósitos de grasa: la subcutánea, la asociada a órganos internos, y la grasa intramuscular (Figura 4), existiendo diferencias sustanciales en la distribución de éstas dentro y entre especies (Gerbens, 2004). En el ganado bovino, luego de la faena, el depósito de grasa intramuscular es el sitio más importante de la deposición representando el 45% de grasa de la carcasa total, mientras que la visceral y subcutánea representan, en promedio, el 38 y 17%, respectivamente (Wegner et al., 1997).

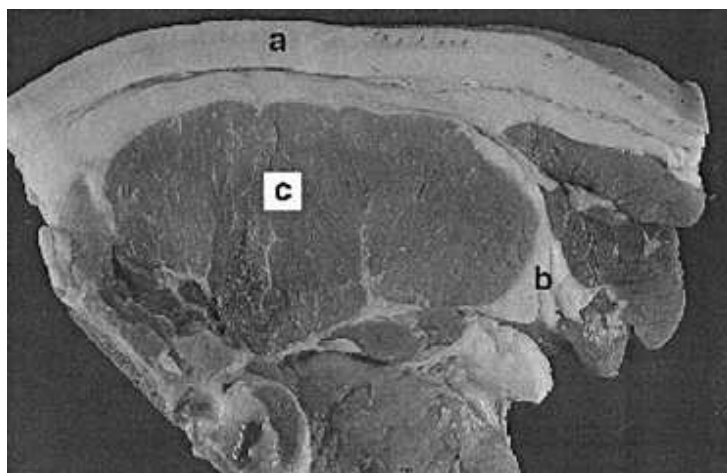


Figura 4. Músculo de cerdo con depósito adiposo: a = grasa subcutánea, b = grasa intermuscular que rodea el tejido muscular, c = grasa intramuscular entre las fibras del tejido muscular (Gerbens, 2004).

El marmoleo es la grasa intramuscular que rodea las fibras musculares (Gerbens, 2004). Morfológicamente, es el total de los lípidos asociados a todas las células presentes en una muestra de carne. Químicamente, estos lípidos se pueden subdividir en los fosfolípidos, triacilgliceroles (TAG), mono-y diacilgliceroles, el colesterol (incluyendo sus ésteres) y ácidos grasos libres. Fosfolípidos y TAG son los principales constituyentes de la grasa intramuscular mientras que la contribución de los otros lípidos, es sólo marginal (Gerbens, 2004).

Los adipocitos, son células altamente especializadas que sirven a la función crucial de almacenamiento, metabolismo y liberación de lípidos (Gerbens, 2004). La adipogénesis intramuscular se inicia a mediados de la gestación en animales rumiantes (Feve 2005, Gnanalingham et al. 2005, Mühlhäusler et al. 2007), la cual se superpone con el período de la miogénesis secundaria (Du et al., 2009). Las células del músculo esquelético y los adipocitos derivan del mismo grupo de células mesenquimales durante la etapa fetal. La mayor proporción de estas se convierten en células miogénicas, sin embargo, una pequeña parte de estas células en el músculo esquelético del feto se diferencian en adipocitos, para formar los sitios de acumulación de grasa intramuscular que producen el marmoleo en las crías (Tong et al., 2009).

Los adipocitos entonces, se originan de células precursoras mesenquimáticas que se diferencian primero en adipoblastos, luego a preadipocitos y finalmente a adipocitos (Miján, 2004). De manera similar a lo que sucede en músculo, los cambios en estos se dan por hiperplasia e hipertrofia (Hood y Allen 1973, Lee et al. 1973, Gondret et al. 1998). En el ganado vacuno, ovino y porcino las células adiposas pueden aumentar fácilmente 1.000 veces su volumen a medida que el diámetro de células crece de 15 a



más de 150  $\mu\text{m}$  (Mersmann, 1991). Así por lo tanto, el contenido de grasa intramuscular puede ser optimizada de tres maneras: con el número óptimo de adipocitos intramusculares (hiperplasia), aumentando el contenido de TAG en estos (hipertrofia), y optimizando el contenido de TAG en los miocitos (Gerbens, 2004). Es así, que un mejor manejo nutricional durante la gestación, aumentaría el número de células mesenquimales, permitiendo incrementar la adipogénesis intramuscular por medio de su hiperplasia (Du et al., 2009).

En dietas de engorde donde el ganado no es alimentado a base de cereales que inducen a la hipertrofia del adipocito, es poco probable que el tamaño de estos se incremente de forma importante. Por lo tanto, el manejo nutricional materno con el fin de aumentar la adipogénesis intramuscular en el feto, es una alternativa para mejorar el marmoleo de las carcasas en el ganado vacuno, alimentado en un futuro con pasturas (Du et al., 2009). Este será más eficaz en las primeras etapas de desarrollo debido a la abundancia de células pluripotentes en el músculo esquelético, las cuales disminuyen conforme aumenta la edad de los animales (Du et al., 2009).

Por lo tanto, a pesar de que estudios en animales y humanos han demostrado que el potencial para generar nuevas células de grasa continúa durante toda la vida (revisado por Smas y Sul 1995, Prins y O'Rahilly 1997), la eficacia del manejo nutricional en la alteración del marmoleo en sistemas pastoriles es mayor en las primeras etapas de desarrollo, luego en la etapa fetal neonatal y por ultimo a los 150-250 días de edad aproximadamente (Du et al., 2009). Además, los nuevos adipocitos generados tardíamente en la vida del animal, están principalmente localizados en los depósitos grasos viscerales, retroperitoneales y subcutáneos, y son pocos los que se localizan en los depósitos intramusculares (Faust et al., 1978). Como se mencionó anteriormente, luego de los 250 días de edad la suplementación nutricional se vuelve menos eficaz en el aumento del número de adipocitos intramusculares debido al agotamiento de las células pluripotentes, aunque el tamaño de los mismos se puede aumentar y es la razón principal para la mejora del marmoleo durante el engorde con dietas ricas en suplementos energéticos.

Durante la diferenciación de los adipocitos, los ácidos grasos son trasladados a través de las membranas antiendomisio y sarcolema, donde son captados por los adipocitos intramusculares o miocitos (Gerbens, 2004). El mecanismo de absorción de ácidos grasos por los adipocitos intramusculares y miocitos se ve facilitada por la enzima lipoproteína lipasa, ubicado en el capilar de las células endoteliales. Éstas son continuamente depositadas en gotas de lípidos que se unen entre sí, formando gotas más grandes, proceso que avanza hasta que la mayor parte del volumen de la célula está ocupado por una sola gran gota de lípido, proceso conductor de la hipertrofia.

Además, del nivel de alimentación durante la gestación, es también importante considerar la composición de la dieta suministrada ya que estudios preliminares en ganado vacuno donde fueron alimentados con diferentes grados de requerimientos de nutrientes, con 100% de sus requerimientos (NRC, 2000) ó 70% de los requerimientos más suplementación con proteína bypass ruminal (70BP), desde el día 60 al 180 de gestación, demostraron que la descendencia de vacas del tratamiento 70BP poseían mas bajo marmoleo en comparación al tratamiento cuyas madres fueron alimentadas con un 100% de los requerimientos (Du et al., 2009).

Información reciente (Stalker et al. 2007, Larson et al. 2009) ofrece evidencia que apoya que el final de la gestación es un período crítico para el desarrollo de marmoleado. Estos investigadores demostraron que los terneros nacidos de vacas suplementadas con proteína tenían carcasas con las puntuaciones más altas de marmoleado, con un mayor porcentaje de carcasas clasificadas como “USDA Choice” y más pesadas que los terneros hijos de vacas pastoreando únicamente campo natural.

## 2.3 REGULACIÓN DEL DESARROLLO MUSCULAR

### 2.3.1 Eje Somatotrófico

El hígado puede considerarse como el principal regulador e integrador del estatus metabólico de los animales, siendo este el sitio primario de síntesis del factor de crecimiento similar a la insulina tipo -I (IGF-I) en respuesta a la unión de la hormona de crecimiento (GH), con su receptor (GHR). Este eje (GH – IGF) es uno de los factores propuestos como mediadores entre los efectos metabólicos nutricionales, el desarrollo fetal y el potencial crecimiento de las crías (Höppener et al., 1985).

Tanto en la etapa fetal, como posnatal, la GH es el principal regulador del crecimiento somático, estimulando procesos anabólicos como la división celular, crecimiento óseo y síntesis proteica (Renaville et al., 2010). La GH actúa directamente sobre los tejidos adiposo, muscular y hepático. Pero muchas veces produce sus efectos anabólicos de forma indirecta, estimulando otras glándulas para que produzcan las sustancias que se encargan de regular el crecimiento (Te Pas et al., 2004). Muchas de las acciones de la GH están mediadas a través del hígado por IGF-I (Le Roith et al. 2001, Wood et al. 2005). Éste es un polipéptido que forma parte de un grupo de factores de crecimiento similares a la insulina (Te Pas et al., 2004) que provoca respuestas biológicas a través de una amplia distribución de receptores (IGFR1) distintos al receptor de insulina (Wood et al., 2005).

Algunos autores han determinado que la IGF-I hepática no se correlaciona con el desarrollo y crecimiento muscular (Sjogren et al. 1999, Yakar et al. 1999). Se cree que la GH ejerce su acción anabólica en el músculo a través de IGF-I sintetizada localmente,

en vez de generar una estimulación directa de las vías anabólicas, por lo que la producción local de IGF-I en el músculo esquelético, actualmente, jugaría un papel predominante para apoyar el crecimiento normal del músculo a través de los mecanismos autocrinos y/o paracrinos (Sjogren et al., 1999). Consecuentemente la aplicación de GH exógena aumenta la expresión ARNm de *IGF1*, pero no la expresión de ARNm de *GHR* en el músculo *Longissimus* de cerdos neonatales (Lewis et al., 2000). Además Chen et al. (2011), informaron que la expresión génica de *IGF1* era significativamente menor en músculo *Longissimus* de lechones en crecimiento limitado, en comparación con animales de crecimiento normal. Sin embargo, hay estudios que demuestran que IGF-I en sangre puede cumplir las funciones específicas del sistema endócrino, ya que la aplicación exógena de IGF-I estimuló el crecimiento de ratas jóvenes y la síntesis de proteínas en el músculo esquelético en cerdos recién nacidos (Hizuka et al. 1986, Davis et al. 2002).

La regulación nutricional de la expresión de *GHR* es específica de cada tejido y a pesar de que el ARNm de *GHR* en el hígado es regulado negativamente por la desnutrición, es aumentada en el músculo esquelético (Weller et al., 1994). En este sentido, Dauncey et al. (1994), Katsumata et al. (2000) informaron que el ARNm de *GHR* en músculo *Longissimus* fue mayor en cerdos con bajas tasas de crecimiento, que cerdos con mayores tasas de crecimiento. Por lo tanto, a un determinado nivel de circulación de la GH, las acciones son específicas y diferentes en los distintos tejidos. En general, las funciones de GH en el metabolismo son anti insulina. Ésta, desvía la regulación al alza de energía en el músculo, y por lo tanto el aumento de su expresión en músculo, debido a la desnutrición, puede ser visto como un mecanismo de priorización del crecimiento neuronal y óseo, a expensas del crecimiento muscular, especialmente durante el desarrollo posnatal (Dauncey et al., 2004).

Tanto el ayuno, como la restricción de proteínas en la dieta, inducen a un aumento en la secreción de GH en los seres humanos, así como en los cerdos, ovejas y vacas (Breier et al. 1986, Thomas et al. 1990, Buonomo y Baile 1991, Thissen et al. 1994, Duan et al. 2004). Contrariamente a lo esperado, a pesar de la secreción de GH alta, los niveles séricos de IGF-I son bajos, lo que indica que estas condiciones representan estados de resistencia a la GH, que puede estar asociada con pérdida de IGFR1 en hígado, la reducción hepática de IGF-I o la disminución del contenido de ARNm de *GHR* en hígado (Breier et al. 1988, Thissen et al. 1994).

Las funciones de IGF-I están mediadas por la unión con sus receptores de IGF (IGFR1 y IGFR2). Tanto el IGF-I e IGF-II se unen al IGFR1 con diversa afinidad afectando la proliferación y diferenciación celular (Philippou et al. 2007, Duan et al. 2010). Tilley et al. (2007) informó que la abundancia de ARNm de *IGFR1* fue mayor en fetos pequeños en comparación con los de tamaño medio. Además, Micke et al. (2011) encontraron que la expresión de ARNm de *IGFR1* en la faena fue mayor en el músculo

de ganado que eran más pequeños en el nacimiento y sugirió que este aumento en la expresión de genes actúa como un efecto compensatorio para promover el crecimiento muscular en animales más pequeños al nacimiento. Además, la expresión de ARNm de *IGFRI* es nutricionalmente regulado en las distintas especies. Matsumura et al. (1996) reportaron que los niveles de transcripción de *IGFRI* aumentaron en el músculo esquelético de pollos de una semana de edad luego de experimentar 5 días de desnutrición, lo que sugiere que la restricción dietética podría aumentar la respuesta del tejido local para IGF-I, al aumentar el número de IGFRI activos presentes en este tejido.

En el músculo esquelético el sistema IGF afecta de manera dependiente del estado de desarrollo fetal, cambios en la expresión de IGF-I y II en el músculo coincidieron con cambios morfológicos en las poblaciones de las fibras musculares (Fahey et al., 2005). En general, los efectos prenatales tienen que ver con la proliferación y diferenciación de las fibras musculares mientras que tras el nacimiento el efecto principal es sobre la hipertrofia. Se encontró en cultivos mioblastos que el IGF-I actúa como un potente agente proliferativo y diferenciador (Florini et al., 1996). De hecho, los niveles de IGF-I e IGF-II en tejido muscular del feto de ovinos, son uniformemente bajos durante toda la gestación, excepto en el momento de formación de fibras secundarias (Dauncey y Gilmour, 1996), las cuales representan la mayor proporción de las fibras totales. Gerrard et al. (1997), reportaron que el aumento en expresión de *IGFI* durante las últimas etapas de gestación, probablemente aumenta la maduración de las fibras musculares en lugar de la proliferación. El mecanismo por el cual el IGF-I induce la hipertrofia de la fibra, implica una combinación de la activación de células satélite y síntesis de proteínas (Barton et al., 1999).

La sensibilidad y la capacidad de respuesta muscular a la GH y de IGF-I puede ser regulada por la disponibilidad de nutrientes, tales como aminoácidos. A pesar de que la infusión de IGF-I, por sí sola no altera la síntesis de proteínas musculares en ratas, cuando el IGF-I se administra en combinación de ciertos aminoácidos, se observa que aumenta significativamente la síntesis de proteína en el *gastrocnemio* (Jacobs et al., 1996). La calidad de la proteína es importante, ya que una dieta rica en aminoácidos esenciales, restaura los niveles séricos de IGF-I más fácilmente en comparación con una dieta rica en aminoácidos no esenciales (Isley et al. 1984, Clemmons et al. 1985).

*In vivo*, IGF se encuentra en asociación con una familia de proteínas de unión de alta afinidad (IGFBP1-6) que afectan su actividad, potenciando o inhibiendo las mismas en los diferentes tejidos (Jones y Clemmons 1995, Duan et al. 2010). Los principales IGFBP expresados en el músculo esquelético son *IGFBP4* e *IGFBP5*, aunque sus funciones en este tejido no son del todo claras. Experimentos han demostrado que los niveles de ARNm *IGFBP4* son más altos durante la proliferación de mioblastos, mientras que la *IGFBP5* se incrementa en la estimulación de la diferenciación de miotubos provocada por el IGF-I y la insulina (Ewton y Florini, 1995).

La IGFBP más abundante en el suero es la IGFBP3, que une a más del 90% de la IGFs en la circulación (Dorup, 2004). Cuando IGF-I forma un complejo con su proteína de unión 3 (IGFBP3/IGF-I), aumenta su vida media y potencia su acción (Jones y Clemmons, 1995), ésta es salvaguardada por hasta 30 minutos en comparación con una vida media de 10 a 12 minutos cuando se encuentra libre en la circulación (Guler et al. 1989, Clemmons 2009).

A nivel de tejidos, IGFBP puede inhibir como potenciar la acción de IGF, impidiendo la unión con su receptor (IGFR1), o liberando el IGF para que se una el mismo (Denley et al., 2005). Tanto el IGF-I e IGF-II tienen una mayor afinidad por IGFBP3 en comparación con su receptor de IGFR1 (Jones y Clemmons, 1995). Como consecuencia, IGFBP3 se une al IGF-I, resultando en una disminución en la biodisponibilidad de IGF-I (Jones y Clemmons 1995, Sadkowski et al. 2009). Consecuentemente, Tilley et al. (2007) encontraron que la abundancia de ARNm de *IGFBP3* muscular fue mayor en los fetos porcinos que eran de pequeño tamaño para su edad gestacional en comparación con los fetos de tamaño normal.

### 2.3.2 Miostatina y TGF- $\beta$

La miostatina, un miembro de la superfamilia de los factores de crecimiento transformantes beta (TGF- $\beta$ ), es un regulador negativo de la masa muscular (McPherron et al., 1997). En el ganado vacuno, las mutaciones que ocurren naturalmente, resultando en la inactivación de la miostatina, dan lugar a una condición denominada doble musculatura, en los que la masa muscular es aumentada considerablemente (Grobet et al., 1997).

Investigaciones recientes muestran que la miostatina regula el número de fibras musculares mediante el control de la proliferación y diferenciación de mioblastos durante la miogénesis temprana, mientras que después del nacimiento la miostatina podría funcionar mediante el control de activación de las células satélite (Kambadur et al., 2004). De forma consistente, estudios en cultivos celulares han mostrado que la miostatina suprimió la proliferación y diferenciación de líneas celulares cultivadas y células primarias miogénicas (Grobet et al., 1997). Además, ratones con mutaciones en la miostatina, tienen más células satélite (responsables de la hipertrofia posparto) y más activas en los músculos en comparación con ratones salvajes (Mc Croskery et al., 2003).

Se han propuesto varios mecanismos responsables de estos cambios, sin embargo el proceso exacto no se ha dilucidado aún. Kamanga-Sollo et al. (2003) reportaron que la miostatina causó incrementos (doble) del ARNm de *IGFBP3* en células embrionarias de cerdos. En este sentido, Dayton y White (2008) postulan que *IGFBP3* mediaría las acciones de la miostatina por la disminución de la producción de co-represores.

### 2.3.3 Esteroides anabólicos

Los esteroides tanto androgénicos como estrogénicos, mejoran significativamente la eficiencia de conversión del alimento, la tasa de ganancia y el crecimiento muscular del ganado de engorde. Los implantes de esteroides anabólicos han sido utilizados como promotores del crecimiento, siendo la combinación de estrógenos y andrógenos más eficaces en la estimulación del crecimiento muscular de los novillos, que cualquiera de estos por separado (Hancock et al. 1991, Hayden et al. 1993, Johnson et al. 1996).

El crecimiento del músculo posparto, generado por esteroides, se basa en la hipertrofia de las fibras musculares, pero no en su multiplicación (Rehfltdt et al., 2004). En este sentido, tanto en humanos como en animales, tratamientos con testosterona aumentaron el diámetro de la fibra muscular, el número de células satélite y el número de mionucleos presentes de forma dependiente de la dosis (Johnson et al. 1998, Bhasin et al. 2001, Sinha Hikim et al. 2002, 2003). De forma consistente, estudios en humanos han demostrado que el tratamiento con testosterona aumentó los niveles de ARNm de *IGF1* en el músculo esquelético (Gayan-Ramírez et al. 2000, Lewis et al. 2002), la cual como se revisó anteriormente, se cree que juega un papel predominante en el crecimiento y desarrollo muscular (Sjogren et al., 1999).

Basado en estos estudios, parecería que el tratamiento con esteroides anabólicos aumentaría los niveles de IGF-I, siendo probable que este mecanismo sea, por lo menos, parcialmente responsable del aumento de número de células satélite, el aumento de núcleos en miofibras, y la mayor hipertrofia celular responsable del aumento del crecimiento muscular observado en animales y humanos implantados (Dayton y White, 2008).

## 2.4 REGULACIÓN DE LA ADIPOGÉNESIS

Los preadipocitos inician su diferenciación en adipocitos bajo la influencia de un gran número de mitógenos y factores de crecimiento (Hwang et al., 1997). Durante el proceso de adipogénesis, una serie de factores de transcripción se activan e inducen de manera organizada para promover la síntesis de proteínas que confieren al adipocito las capacidades metabólicas que les son propias, principalmente lipogénesis, lipólisis regulada, producción y sensibilidad a hormonas (Miján, 2004).

Algunas de las proteínas que regulan la diferenciación temprana de los adipocitos han sido identificadas (revisado por: Smas y del Sur 1995, Hwang et al. 1997, Castillo et al. 1999, Lane et al. 1999, Lazar 1999), dos clases de factores de

transcripción son; CAAT/incrementador de proteínas de unión (C/EBP) y el receptor activador de la proliferación de peroxisomas  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ).

Los miembros de la familia C/EBP ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ ) son sustancias proteicas que se unen a las regiones reguladoras de los genes, aumentando su expresión. Durante la primera fase de la adipogénesis, C/EBP $\alpha$  es inducida y se une directamente al promotor de PPAR $\gamma$  e induce su expresión (Clarke et al. 1997, Wu et al. 1999). La expresión de PPAR $\gamma$  promueve aún más la expresión de C/EBP $\alpha$ , generando ciclos de feed-back positivos. La diferenciación terminal de un adipocito requiere la acción conjunta de PPAR $\gamma$  y C/EBP (Hwang et al., 1997). El PPAR $\gamma$  puede estimular la diferenciación del adipocito por sí solo, pero no el C/EBP $\alpha$  (Rosen et al., 2002). Sin embargo, en presencia de glucocorticoides e insulina, la sobre expresión del C/EBP $\alpha$  es suficiente para inducir la diferenciación adipocitaria (Miján, 2004).

La activación de PPAR $\gamma$  promueve la diferenciación terminal a través de la inducción de una serie de genes importantes para la absorción y almacenamiento de triglicéridos, tales como proteínas de unión a ácidos grasos, acil-CoA sintetasa, proteínas transportadoras de ácidos grasos, la lipoproteína y otros (Frohnert et al. 1999, Rosen y MacDougald 2006). A su vez, los ácidos grasos de cadena larga (AGCL), independientemente de su grado de insaturación, promueven la conversión de preadipocitos en adipocitos maduros. Su efecto estaría mediado por PPAR $\beta$  el cual se expresa en etapas iniciales de la adipogénesis cuando PPAR $\gamma$  está presente a muy bajo nivel. Activado por los AGCL, PPAR $\beta$  promovería la transcripción de PPAR $\gamma$  (Miján, 2004). Desde el punto de vista fisiológico tiene sentido que los ácidos grasos favorezcan la expresión de tejido adiposo tras la ingesta de un exceso de alimento (Miján, 2004).

Se han identificado las proteínas de unión del elemento regulador de esteroides (SREBPs), las cuales son factores de transcripción que controlan el metabolismo lipídico regulando genes implicados en las rutas de síntesis y captación de colesterol, síntesis de ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos, y genes que controlan el metabolismo glucídico (Bobard et al., 2004). Se han identificado tres isoformas, SREBP1a, SREBP1c y SREBP2, las cuales tienen diferentes roles en la síntesis lipídica. En tejidos y órganos diferenciados, la SREBP1c está involucrado con ácidos grasos, mientras que el SREBP2 juega un rol importante en la regulación de la síntesis de colesterol. La SREBP1a es expresada en células en crecimiento proveyendo colesterol y ácidos grasos que son requeridos para la síntesis de la membrana (Bobard et al., 2004).

Las SREBPs son sintetizadas como precursores inactivos unidos a la membrana del retículo endoplasmático. Posteriormente a la activación, el precursor se somete a procesos de escisión para liberar el dominio activo -NH terminal en el núcleo (Dils y Knudsen, 1980). El procesamiento de los SREBPs es controlado mayoritariamente por los contenidos celulares de esterol. Cuando los niveles de esterol disminuyen, el

precursor es roto para activar los genes colesterogénicos y mantener la homeostasis de colesterol.

Este proceso sensible al esteroles, aparentemente es uno de los principales puntos de regulación de las isoformas 1 y 2, pero no la 1c, que parece estar principalmente regulado a un nivel transcripcional por la relación insulina/glucagón. En adultos la isoforma SREBP-1c es la predominantemente transcrita en el hígado de animales alimentados, y ésta activa la producción de triglicéridos desde glucosa cuando la dieta es enriquecida en carbohidratos, la expresión de *SREBP-1c*, además de depender de la insulina, también depende de la disponibilidad de oxysteroles y ligandos del receptor nuclear X del hígado (LXR). Sin embargo, durante el amamantamiento se observó una alta expresión de ARNm de *SREBP-1c* a pesar de las muy bajas cantidades de insulina en el plasma (Bobard et al., 2004).

*In vivo*, una reducción del ARNm de *SREBP-1c* se observó en animales en ayuno, mientras que en ratones realimentados con una dieta rica en carbohidratos genera un aumento fuerte de la transcripción de *SREBP-1c* (Horton et al., 1998). El SREBP-1c ha sido visto como el mayor mediador de la acción de la insulina en la expresión de glucoquinasa y genes relacionados con la lipogénesis en hepatocitos cultivados de ratas (Foretz et al., 1999) e *in vivo* (Becard et al., 2001). En el hígado de animales adultos la insulina induce la transcripción de *SREBP-1c*, pero también ha sido sugerido que la insulina aumenta la abundancia nuclear de SREBP-1c (Shimano et al. 1997, Kim et al. 1998).

A diferencia de otros tejidos con elevados niveles de expresión de *SREBP1c*, el músculo no es un tejido altamente lipogénico. No obstante, existen depósitos de triglicéridos que varían en distintas condiciones fisiopatológicas. Por otro lado, una desregulación en el metabolismo lipídico muscular con disminución en la oxidación de ácidos grasos y elevación en la deposición lipídica se ha asociado con la resistencia a insulina en doble musculados y obesidad. Se ha descrito que SREBP1 podría participar en este fenómeno aumentando la expresión de genes de enzimas como la ácido graso sintasa y citrato liasa. A pesar de estas evidencias, la regulación y actividad de SREBP1c en músculo está mucho menos estudiada que en hígado o tejido adiposo.

Existen reportes de que la proteína de unión del elemento regulador de esteroles (SREBP1) también es otro factor de transcripción que regula la diferenciación de los adipocitos (Yu et al., 2006). En este sentido, se ha reportado que, tanto SREBP-1 como SREBP-2, pueden inducir la transcripción *PPAR $\gamma$*  a través de la unión a regiones promotoras (Fajas et al., 1999).



## 2.5 HIPOTESIS

La suplementación en vacas de carne durante el último mes de gestación, podría modificar los perfiles endócrinos y la expresión de genes relacionados con el desarrollo de fibra y la adipogénesis muscular en sus terneros al destete. Esto podría mejorar el desarrollo muscular y el maromoleo de sus crías, generando un mayor potencial de crecimiento y mejor calidad del producto. Estas ventajas pueden estar dadas directamente por efectos gestacionales y/o indirectamente por mejoras durante la lactación.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 LOCALIZACIÓN Y PERÍODO EXPERIMENTAL

El experimento se realizó en la Unidad Experimental Palo a Pique perteneciente a la Estación Experimental del Este de INIA Treinta y Tres (Uruguay). Este se realizó de acuerdo a protocolos aprobados por la Unidad Experimental y por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, UdelaR). El período experimental comenzó el 15 de agosto de 2008 con el acostumbramiento de las vacas al suplemento y culminó el 18 de marzo de 2009 con el destete de los terneros.

#### 3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL, ANIMALES Y TRATAMIENTOS

Se utilizaron 10 terneros machos hijos de vacas multíparas de biotipo cruza (Anexo 1) en un diseño de bloques completos al azar, las madres fueron asignadas a dos tratamientos nutricionales durante el último mes de gestación: 1) testigo (pastoreo de campo nativo, n = 5; Cuadro 1) y 2) suplementación preparto (pastoreo de campo nativo + 1% del peso vivo, aproximadamente 4,5 kg/a/d de afrechillo de arroz, n=5; Cuadro 1) desde el día  $40 \pm 1,3$  preparto hasta el parto. Antes, durante y luego del tratamiento nutricional, todos los animales fueron manejados en forma conjunta sobre pastoreo directo en campo nativo (Cuadro 1) con buen acceso a aguadas. Los animales suplementados, fueron llevados diariamente (en la mañana) a los comederos que se encontraban en una sub-división dentro del mismo potrero. Una vez finalizado el consumo de la ración, volvían al potrero con el resto de los animales. No se registró rechazo del suplemento ofrecido.

Al momento del destete (edad  $180 \pm 0,6$  días) se determinó el PV de los terneros, se extrajeron muestras de sangre y se colectaron muestras del músculo *Semitendinoso* mediante biopsias. Las muestras de sangre se extrajeron por venipunción de la vena yugular en tubos Vacutest® (Kima, Arzergrande, Italia, de 10 mL de vidrio) sin anticoagulante. Las muestras de sangre se centrifugaron (2000 x g, 15 min) para la extracción de suero y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. 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 8 cm del hueso isquión. Luego de lavar, afeitar, desinfectar y anestésiar localmente la región (Lidocaína 2%; 4 mL), se colectó con bisturí una muestra de  $2\text{ cm}^3$  (aproximadamente 2 grs). La muestra se lavó con suero fisiológico conservándose la mitad de la misma ( $1\text{ cm}^3$ ) en formol buffer (al 4%) para realizar determinaciones histológicas. La otra mitad fue conservada en nitrógeno líquido para luego ser almacenada en un freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis molecular (Anexo 2).

Cuadro 1. Composición química del campo nativo y suplemento utilizado.

Alimento	Campo Nativo			Afrechillo de arroz
	Invierno -40 a 0 DPP <sup>1</sup>	Primavera 0 a 90 DPP	Verano 90 a 180 DPP	
Disponibilidad (kg MS/ha)	1169	1178	1245	-
Asignación de forraje (kg MS/100 kg PV)	8,1	8,2	7,3	-
Composición química (% MS)				
Proteína cruda	11,3	8,9	8,6	15,2
Fibra detergente neutro	68	66	69	31,7
Fibra detergente ácido	44,5	38,0	38,8	13,8
Digestibilidad materia orgánica (%)	51,5	59,3	58,4	-

<sup>1</sup>DPP= días posparto

### 3.3 DETERMINACIONES

#### 3.3.1 Determinaciones hormonales

Las concentraciones de insulina e IGF-I se determinaron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria (UdelaR), utilizando kits comerciales (DIASource INS-IRMA KIP1251, DIASource ImmunoAssays S.A., Bélgica; e IGF-I-RIACT Cis Bio International, GIF-SUR-YVETTE CEDEX, Francia, respectivamente). Todas las muestras se analizaron en un único ensayo para cada hormona. La sensibilidad del ensayo de insulina fue de 3,2  $\mu$ UI/mL y los coeficientes de variación (CV) intra-ensayo para el control 1 (20,8  $\mu$ UI/uL) y control 2 (63,6  $\mu$ UI/uL) fueron de 6,6 y 7,9%, respectivamente. La sensibilidad del ensayo para IGF-I fue de 2.7 ng/mL y los CV intra-ensayo para el control 1 (75 ng/mL) y control 2 (200 ng/mL) fueron de 5,2 y 5,0%, respectivamente.

#### 3.3.2 Determinaciones histológicas

El procesamiento histológico se llevó a cabo en el Laboratorio de Histología de la Facultad de Veterinaria (UdelaR). Las muestras fueron incluidas en bloques de parafina mediante técnicas histológicas estándar (Anexo 3) y se realizaron cortes seriados transversales en la región media de la muestra (6  $\mu$ m; model 2030 Reichert-Jung, Germany), obteniéndose 4 muestras de cada animal. Las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina (Anexo 4) para visualizar la morfología del músculo (Bayol et al., 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, Japan) equipado con una cámara fotográfica INFINITY1-3c (3.1 Megapixel Color CMOS Camera, y LuSDK: Software Developer's Kit, Lumenera Corporation, Ottawa, Canada) y fueron analizadas con el software de análisis de imágenes INFINITY Camera Software v5.0.3 (Lumenera Corporation).

El número de fibras se calculó mediante el examen de un mínimo de 450 fibras musculares por animal y el diámetro se determinó como el promedio del diámetro aparente mayor y menor de 300 fibras como mínimo. Esto se hizo para minimizar los errores asociados con las fibras que no se hayan cortado exactamente perpendiculares a la dirección de la fibra. El número total aparente de fibras musculares se estimó a partir del área de la sección transversal y la densidad de las fibras musculares (número de fibras/ $\mu\text{m}^2$ ).

### 3.3.3 Aislamiento del ARN total y síntesis de ADNc

La extracción de ARN total y la síntesis de ADNc se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Agronomía (UdelaR). La extracción de ARN total se realizó con TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA) seguido de un tratamiento con ADNasa (DNasa Free Kit™; Ambion, Austin, TX, EEUU), para eliminar restos de ADN contaminante. La concentración de ARN total se determinó mediante absorbancia a 260 nm. La calidad e integridad del ARN aislado se evaluó con las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 nm, (NanoDrop ND-100 Spectrophotometer Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, EEUU) y mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Figura 5), respectivamente. La retrotranscripción (RT) se realizó utilizando el kit SuperScript®II (Invitrogen) con hexámeros no específicos y 1  $\mu\text{g}$  de ARN. El ADNc que se obtuvo fue almacenado a  $-20^\circ$  hasta su posterior análisis.

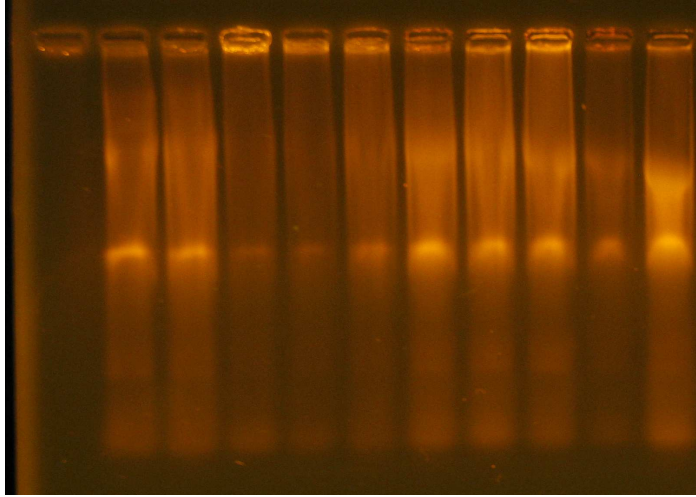


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ARN total extraído del músculo *Semitendinoso*.

#### 3.3.4 PCR en tiempo real

Se utilizaron primers específicos (Cuadro 2) que amplificaron ADNc para los genes de interés relacionados al eje GH-IGF (*GHR*, *IGF-I* e *IGFBP-3*), el receptor de insulina (*INSR*), y asociados a la adipogénesis (*PPAR $\gamma$*  y *SREBP1*) y un control endógeno: hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (*HPRT*). 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 10  $\mu$ L SYBR Green (Quantisys, Biotools B&M Labs, Madrid) y 3  $\mu$ L de ADNc diluido (1:7.5 en RNasa / DNasa libre de agua) en un volumen final de 20  $\mu$ L. Las muestras fueron analizadas en duplicado en un Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney) en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria (UdelaR). Las condiciones de amplificación fueron de 10 min a 95° C y 40 ciclos de 15 seg a 95° C, 45 seg a 60° C y

Cuadro 2. Primers usados para la cuantificación de los genes de interés y el control endógeno.

Gen <sup>1</sup>	No. de Acceso <sup>2</sup>		Secuencia	Largo (pb)	Referencia
<i>GHR</i>	NM_17768	Sentido	TCTGGGAATCCTAAATTCACCAA	91	Carriquiry et al. (2009)
		Antisentido	CTGTAAACTGTGATTAGCCCCATCT		
<i>IGF-I</i>	XM_61412	Sentido	CCAGACAGGAATCGTGGATG	89	Carriquiry et al. (2009)
		Antisentido	ACTTGGCGGGCTTGAGAG		
<i>IGFBP3</i>	NM_17455.1	Sentido	AGCACAGACACCCAGAACTTCT	86	Carriquiry et al. (2009)
		Antisentido	TTCAGCGTGTCTTCCATTTC		
<i>INSR</i>	XM_590552.4	Sentido	CTTGAAGCCAAGGCAGATGATATT	77	Astessiano et al. (2011)
		Antisentido	GCCACATCAAGTGAACAACGTT		
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	NM_181024	Sentido	CAGTGTCTGCAAGGACCTCA	128	Achard et al. (2010)
		Antisentido	GATGTCAAAGGCATGGGAGT		
<i>SREBP1</i>	NM_00111302	Sentido	CTACATCCGCTTCCTTCAGC	93	Achard et al. (2010)
		Antisentido	TCCTTCAGCGATTTGCTTTT		
<i>HPRT</i>	XM_580802	Sentido	TGGAGAAGGTGTTTATTCCTCATG	105	Carriquiry et al. (2009)
		Antisentido	CACAGAGGGCCACAATGTGA		

<sup>1</sup>*GHR* = receptor de la hormona de crecimiento, *IGF-I* = factor de crecimiento similar a la insulina-I, *IGFBP3* = proteína de unión de IGF-3, *INSR* = receptor de la insulina, *PPAR $\gamma$*  = receptor activador de la proliferación de peroxisoma- $\gamma$ , *SREBP1* = proteína de unión del elemento regulador del estero1-1, *HPRT* = hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa.

<sup>2</sup>Número de acceso GenBank.

20 seg a 72° C. Las curvas de desviación fueron generadas luego del último ciclo para verificar la amplificación de un único producto de PCR. Para la cuantificación absoluta se generaron curvas estándar (n=6 de 10<sup>6</sup> a 10<sup>1</sup> copias de gen/μL) utilizando plásmidos que codificaban los genes de interés y el control endógeno. Para estimar el número de copias de ARNm de las muestras se utilizaron regresiones lineales, la expresión de cada uno de los genes de interés se normalizó a la expresión del control endógeno. El gen o transcripto *HPRT* ha sido usado previamente como control endógeno en tejidos de rumiantes (Carriquiry et al. 2009, Astessiano et al. 2011) y su expresión no difirió en el presente trabajo entre los grupos (P > 0,159; Figura 6).

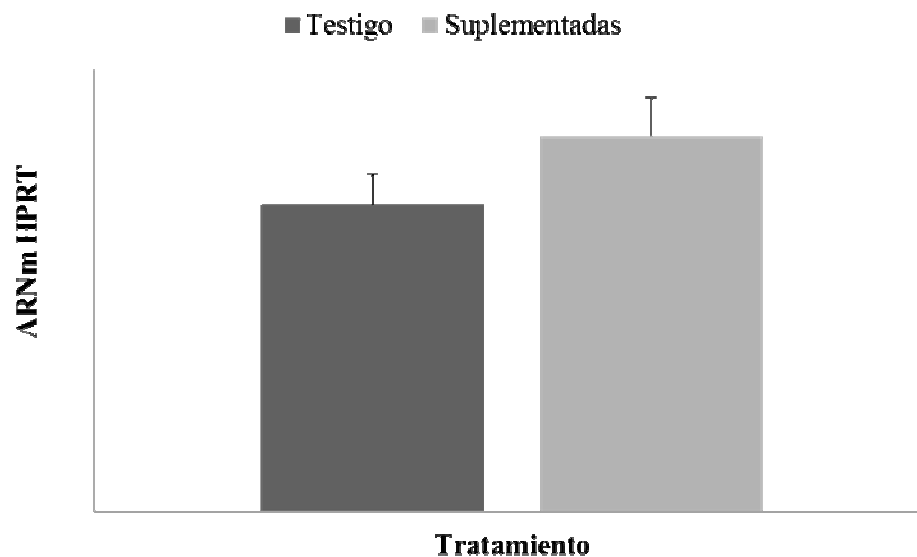


Figura 6. Expresión del ARNm de *HPRT* (control endógeno) según tratamiento, expresado en número de moléculas de *HPRT*.

#### 3.4 ANALISIS ESTADISTICO

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico SAS (versión SAS 9.0V, del SAS Institute). Los datos de PV, hormonas y expresión de genes en músculo se analizaron usando el procedimiento MIXED con un modelo que incluyó el tratamiento como efecto fijo, el bloque y el biotipo como efectos aleatorios y la edad y/o el peso del animal como covariable (si  $P > 0,20$ ). La separación de medias se realizó con una prueba de mínima diferencia significativa ( $\alpha = 0,05$ ). Los coeficientes de correlación de Pearson para describir las relaciones entre las variables se estimaron utilizando el procedimiento CORR. Los datos fueron expresados como LSMeans  $\pm$  error estándar. Las medias se consideraron diferentes cuando  $P \leq 0,05$  y la tendencia a diferir entre medias se estableció cuando  $0,05 < P \leq 0,10$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 PESO VIVO DEL TERNERO AL DESTETE

La suplementación preparto no tuvo efecto sobre el PV al destete ( $P = 0,331$ ), siendo de  $185 \pm 3$  kg para terneros hijos de vacas suplementadas y de  $181 \pm 3$  kg para los terneros hijos del grupo testigo.

### 4.2 CONCENTRACIONES DE INSULINA E IGF-I

La suplementación durante el último mes de gestación tendió a disminuir ( $P = 0,076$ ) las concentraciones de IGF-I en suero en los terneros al destete, pero las concentraciones de insulina no fueron afectadas ( $P = 0,513$ ) por el tratamiento nutricional de las madres durante el último mes de gestación (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de la suplementación de las madres durante el último mes de gestación sobre las concentraciones de IGF-I e insulina en plasma de los terneros al destete.

Hormonas	Tratamientos <sup>1</sup>		ES	Valor P
	SUP	TEST		
IGF-I ( $\mu$ UI/ml)	44.4	68.9	7.7	0.076
Insulina ( $\mu$ UI/ml)	5.6	7.2	1.3	0.513

<sup>1</sup>Tratamiento nutricional; SUP: terneros hijos de vacas pastoreando campo nativo suplementadas a 1% del PV con afrechillo de arroz durante el último mes de gestación ( $n = 5$ ), TEST: hijos de vacas pastoreando campo nativo (testigo,  $n = 5$ ).

### 4.3 NÚMERO Y TAMAÑO DE FIBRAS MUSCULARES

Tanto el diámetro de las fibras musculares en el músculo *Semitendinoso* como el número aparente de fibras musculares de los terneros al destete no difirió ( $P > 0,116$ ) entre tratamientos (Cuadro 4). Sin embargo la densidad de fibras fue mayor ( $P = 0,0229$ ) en hijos de vacas suplementadas.



Cuadro 4. Efecto de la suplementación de las madres durante el último mes de gestación sobre el número y diámetro de la fibra del músculo *Semitendinoso* de los terneros al destete.

	Tratamientos <sup>1</sup>		ES	Valor P
	SUP	TEST		
Fibras musculares				
Número aparente (x 10 <sup>6</sup> )	1,0	1,02	0,04	0,794
Diámetro (µm)	68,5	72,2	1,6	0,116
Densidad (fibras/µm <sup>2</sup> )	2,86 x 10 <sup>-4</sup>	2,44 x 10 <sup>-4</sup>	0,33 x 10 <sup>-4</sup>	0,0229

<sup>1</sup>Tratamiento nutricional; SUP: terneros hijos de vacas pastoreando campo nativo suplementadas a 1% del PV con afrechillo de arroz durante el último mes de gestación (n = 5), TEST: hijos de vacas pastoreando campo nativo (testigo, n = 5).

#### 4.4 EXPRESION GENICA EN EL MUSCULO SEMITENDINOSO

La expresión de ARNm de *GHR*, *IGF1* e *INSR* en el músculo *Semitendinoso* de los terneros al destete, no fue afectada ( $P \geq 0,331$ ) por la suplementación de las madres durante el último mes de gestación (Cuadro 5). Sin embargo el ARNm de *IGFBP3* fue menor ( $P = 0,022$ ) en terneros hijos de vacas suplementadas que en los terneros hijos del grupo testigo (Cuadro 5).

La abundancia de ARNm de *SREBP1* no fue afectada ( $P = 0,806$ ) por el tratamiento nutricional de las madres durante último mes de gestación (Cuadro 5). Sin embargo, la expresión del transcripto *PPARγ* fue mayor ( $P = 0,044$ ) en terneros hijos de vacas suplementadas que en los terneros hijos del grupo testigo (Cuadro 5).

Independientemente del tratamiento nutricional, la expresión de ARNm de *SREBP1*, se encontró positivamente correlacionada con la expresión de ARNm de *GHR* ( $r = 0,71$   $P = 0,022$ ) y con la expresión de ARNm de *INSR* ( $r = 0,72$   $P = 0,018$ ).

Cuadro 5. Efecto de la suplementación de las madres durante el último mes de gestación sobre la expresión génica en músculo *Semitendinoso* de terneros al destete.

Genes <sup>1</sup>	Tratamientos <sup>2</sup>			Valor P
	SUP	TEST	ES	
<i>GHR</i>	1.72	1.51	0.53	0.792
<i>IGF-I</i>	0.09	0.08	0.02	0.829
<i>IGFBP3</i>	0.10	0.28	0.04	0.022
<i>INSR</i>	60.9	97.3	24.8	0.331
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	0.11	0.04	0.02	0.044
<i>SREBP1</i>	48.3	42.6	15.7	0.806

<sup>1</sup>*GHR*= receptor de la hormona de crecimiento, *IGF-I* = factor de crecimiento similar a la insulina-I, *IGFBP3* = proteína de unión de *IGF-3*, *INSR* = receptor de insulina, *PPAR $\gamma$*  = receptor activador de la proliferación de peroxisomas- $\gamma$ , *SREBP1*= proteína de unión al elemento regulador del estero1-1.

<sup>2</sup>Tratamiento nutricional; SUP: terneros hijos de vacas pastoreando campo nativo suplementadas a 1% del peso vivo con afrechillo de arroz durante el último mes de gestación (n = 5), TEST: hijos de vacas pastoreando campo nativo (testigo, n = 5).

## 5. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo indican que la suplementación al final de la gestación, afectó la expresión de ARNm en músculo *Semitendinoso* del eje GH-IGF (IGFBP-3) así como componentes relacionados con la regulación de la adipogénesis (*PPAR $\gamma$* ) en terneros al destete. Indicando esto último, cambios en el potencial de marmoleo de los terneros al destete. Lo cual posibilitaría de esta manera, conseguir el objetivo de lograr carcasas más pesadas con mayor grado de marmoleo en menor tiempo (Martin et al. 2008, Funston et al. 2010), siendo una ventaja económica, y productiva a nivel país.

La información internacional es consistente sobre el impacto negativo en el desarrollo muscular y adipogénesis provocado por la subnutrición fetal (Stickland 1978, Dwyer y Stickland 1991, Ward y Stickland 1991, Rehfeldt et al. 1993, Dwyer et al. 1994, Dwyer et al. 1995, Greenwood et al. 1999, Bayol et al. 2004, Stannard y Johnson 2004, Zhu et al. 2004, Stalker et al. 2007, Du et al. 2009, Larson et al. 2009, Rehfeldt et al. 2011). Sin embargo, la información generada del efecto provocado por una mejora en la alimentación en el último tercio de gestación sobre estas características, es escasa (Freetly et al. 2000, Martin et al. 2008, Larson et al. 2009, Caton y Hess 2010). Más aún, si se consideran las condiciones de producción predominantes de nuestro país, caracterizadas entre otras cosas, por balances energéticos desfavorables al final del período de gestación (Orcasberro, 1991). Es importante reafirmar, que el efecto de la suplementación durante la gestación, implica una mejora en el estatus nutricional de la madre, el cual controla directamente el crecimiento, proporcionando glucosa, aminoácidos y otros nutrientes esenciales y metabolitos para el feto (Robinson et al., 1999).

Cabe destacar, que este trabajo se discute bajo el supuesto de que existe una relación lineal entre la abundancia de ARNm de un determinado gen y su posterior traducción a la proteína, la cual ejerce su función determinada en el organismo. Asumiendo entonces, que la abundancia del primero, es un buen estimador de éste último y viceversa. Sin embargo esto no es siempre cierto ya que existen mecanismos pos transcripcionales de regulación.

No se encontraron diferencias significativas en peso al nacimiento y destete de los terneros como consecuencia de la suplementación preparto. Estos resultados son similares a los encontrados por Lammoglia et al. (1996), Alexander et al. (2002), Small et al. (2004). Parece ser de suma importancia, en la determinación del peso al nacimiento, la duración, el periodo y el grado de variación de la nutrición durante la gestación, al que la vaca es sometida. Aumentos en el peso al nacimiento se reportaron con suplementaciones preparto mas prolongadas (último tercio de gestación), ya sea con

alimentos proteicos, como los reportadas por Larson et al. (2009), o bien, suplementaciones energéticas (Corah et al., 1975). Sin embargo, el peso al nacer de los terneros hijos de vacas suplementadas fue numéricamente mayor y esta diferencia por encima del grupo testigo se mantuvo hasta el destete, aunque en ningún caso fue estadísticamente significativa, posiblemente, el bajo número de animales (n= 5) utilizados por tratamiento, pudo afectar este resultado.

Por otro lado, nuestros resultados indican que la suplementación preparto de las madres no afectó la abundancia de ARNm de *GHR* en el músculo de los terneros al destete. Consecuentemente con la ausencia de diferencias en el peso vivo al nacimiento y destete registradas, lo cual supone tasas de crecimiento similares entre los tratamientos, Weller et al. (1994), Katsumata et al. (2000) plantean que la expresión de *GHR*, puede verse afectada, en casos en que la tasa de crecimiento también es afectada, por lo cual, actuaría en este caso como un mecanismo compensatorio.

Sin embargo, los terneros hijos de vacas suplementadas durante el último mes de gestación, presentaron menor concentración de IGF-I en sangre. Esto, confirma lo afirmado por Sjogren et al. (1999), el cuál reporta que es la producción local de IGF-I y no la IGF-I circulante, la que en músculo esquelético, jugaría un papel predominante en el crecimiento normal del músculo a través de los mecanismos autócrinos y/o parácrinos. Consecuentemente, no se encontraron diferencias en el número ni el diámetro de las fibras musculares que acompañen esta menor concentración de IGF-I en sangre. Este resultado, podría explicarse con los resultados de expresión hepática generados por Pereyra et al. (2009), sobre los mismos terneros, donde la expresión hepática de ARNm de *GHR* disminuyó y la de *IGFBP3* tendió a ser mayor en los terneros hijos de vacas suplementadas. El hígado, es el sitio primario de síntesis de IGF-I en respuesta a la unión de la GH con GHR, esta tendencia a disminuir concentración de IGF-I podría explicarse entonces, a causa de una posible disminución de receptores de GH. Confirmando esto, Wang et al. (2003) reportaron que los niveles de IGF-I en sangre y la expresión hepática de *IGFI* se asociaron con menores niveles de ARNm de *GHR*. De todas formas otros autores como Schneider et al. (2010) reportaron en vacas de carne, que la concentración de IGF-I no se correlacionó con la abundancia de ARNm de *GHR* en hígado, resaltando en este caso el papel de las proteínas de unión IGFBPs, las cuales podrían estar modulando su acción (Duan y Xu, 2005).

Como se mencionó anteriormente, el número de fibras musculares de los terneros al destete no fue afectado por la nutrición durante la etapa fetal. De forma consistente Bayol et al. (2004) determinó en ratas, que el número de fibras musculares medido a los 21 días posparto no fue alterado en madres restringidas un 40 y 50% *ad libitum* al final de la gestación, aunque si se redujo el número de núcleos en la fibra y consecuentemente su futura hipertrofia. Consistentemente, se ha reportado que cambios moderados en la nutrición fetal luego de la maduración del músculo esquelético (día 210 en vacunos) no tendrían impacto en el número de fibras musculares (Du et al., 2009).

Sin embargo, podrían esperarse aumentos en la hipertrofia muscular, evidenciado por un mayor diámetro de fibra (Greenwood et al., 1999).

Sin embargo, el diámetro promedio de las fibras musculares de los terneros al destete, tampoco fue afectado por la suplementación preparto. Si bien, la suplementación se realizó en un periodo donde el diámetro de la fibra muscular es sensible a la nutrición fetal (Greenwood et al. 1999, Mc Coard et al. 2000, Du et al. 2009), el nivel y/o el período de ésta, no fue el adecuado para generar dichos cambios. Dado que la masa muscular, está determinada por el número de fibras y su tamaño (Houba y te Pas, 2004), ante ausencias de diferencias significativas en el número de fibras musculares y del peso al destete, era esperable que el diámetro tampoco haya sido afectado.

En concordancia con la ausencia de diferencias significativas en el diámetro de las fibras musculares, la suplementación no afectó la expresión de ARNm de *IGF1* en el músculo de los terneros al destete, la cuál se cree que tiene un efecto muy importante en la regulación del crecimiento y desarrollo muscular (Sjogren et al., 1999). Resultados similares fueron encontrados por Gutierrez (2011) en madres multíparas, en el cual los terneros al destete hijos de madres pastoreando alta y baja oferta de forraje durante la gestación, no presentaron diferencias en la expresión de *IGF1*. Contrariamente, Laporta et al. (2009) encontró que terneros hijos de vacas primíparas, suplementadas en el último mes de gestación, presentaron al destete mayor expresión de *IGF1* en músculo. Pudiéndose atribuir estas diferencias, al metabolismo diferencial que las vacas primíparas presentan, o bien, a las características del suplemento utilizado.

De todas formas, la acción local de IGF-I, pudo haber sido afectada indirectamente por modificarse los componentes del sistema IGF, a través de la acción de IGFBP3, ya que su expresión en músculo fue inferior en los terneros hijos de madres suplementadas. En este sentido, se ha reportado que IGFBP3 se une al IGF-I, impidiendo la unión con su receptor, resultando en una disminución de su biodisponibilidad, limitando su acción (Jones y Clemmons 1995, Sadkowski et al. 2009). Tilley et al. (2007) encontraron que la abundancia de ARNm de *IGFBP3* fue mayor en los músculos de fetos porcinos que eran de pequeño tamaño para su edad gestacional en comparación con los fetos de tamaño normal. Se sugeriría entonces, que a pesar de no haber encontrado diferencias significativas en la expresión de *IGF1*, la suplementación supondría un mayor potencial de crecimiento y desarrollo muscular de terneros al destete, afectando la acción de IGF-I, efecto mediado por su IGFBP3.

La insulina en sangre de los terneros al destete, no fue afectada por la suplementación de las vacas. Consistentemente, Gutierrez (2011) determinó que los niveles de insulina al destete, no fueron modificados en terneros hijos de madres que pastoreaban altas ofertas de forraje versus bajas durante la gestación y lactancia. Es importante aclarar, que al tratarse de un diseño experimental sin medidas repetidas en el tiempo, los resultados obtenidos, son indicadores únicamente del estatus metabólico en

un momento determinado (Laporta, 2011). Siendo en este sentido, IGF-I plasmática un indicador más estable que la insulina, debido a la duración de su vida media y sensibilidad al consumo (Thissen et al., 1994). Consistentemente con los niveles similares de insulina en sangre, en el presente trabajo, no se registraron cambios en la expresión de ARNm de *INSR* en el músculo de los terneros. La bibliografía sugiere, que las modificaciones en la sensibilidad tisular mediada por la abundancia de receptores activos, parecería modificarse ante cambios más abruptos en la nutrición, que los provocados por una suplementación de este tipo. Consecuentemente, ovejas alimentadas al 50% de sus requerimientos (NRC, 1985), durante el último mes de gestación, provocó un aumento en la expresión de ARNm de *INSR* en músculo esquelético de corderos al nacimiento (Lehnert et al., 2007). Resultados similares fueron reportados por Costello et al. (2008) en músculo de ovejas restringidas tardíamente. Se sugiere entonces, que este aumento de la expresión génica actúa como un efecto compensatorio en los animales más livianos para promover el crecimiento muscular.

Las células del músculo esquelético y los adipocitos derivan del mismo grupo de células madre mesenquimales durante la etapa fetal, de las cuales la mayoría se convierten en células miogénicas. Sin embargo, una pequeña parte de estas células del músculo esquelético del feto se diferencian en adipocitos para formar los sitios de grasa intramuscular, que producen el marmoleado (Tong et al., 2009), para esto los factores de transcripción, *PPAR $\gamma$*  y *SREBP1*, participan en la diferenciación de las células precursoras a adipocitos (Yu et al., 2006).

La suplementación preparto de las madres incrementó la expresión del transcripto *PPAR- $\gamma$*  en sus terneros en relación al grupo testigo, lo que induciría una mayor hiperplasia de adipocitos (Rosen et al., 2002) y como respuesta a esto se esperaría un mayor impacto en el grado de marmoleo en los músculos de estos animales. Sin embargo Achard et al. (2010) no encontraron diferencias en la expresión del transcripto *PPAR- $\gamma$*  en terneros al nacimiento de diferentes biotipos (Hereford-Hereford y Hereford-Bonsmara). La activación de *PPAR $\gamma$*  promueve la diferenciación terminal a través de la inducción de una serie de genes importantes para la absorción y almacenamiento de triglicéridos, tales como proteínas de unión a ácidos grasos, acil-CoA sintetasa, proteínas transportadoras de ácidos grasos, lipoproteína lipasa y otros (Frohnert et al. 1999, Rosen y MacDougald 2006).

Por el contrario la abundancia de ARNm de *SREBP1* no fue afectada por el tratamiento nutricional de las madres durante el último mes de gestación. El efecto que produce *SREBP1* en adipogénesis es mediante la estimulación de la hipertrofia de los adipocitos. Según Du et al. (2009) después de 250 días de edad la suplementación energética produce un efecto en el tamaño de los adipocitos, antes lo que se afecta es el número total de los mismos. Lo que indica que antes de los 250 días se puede ver un efecto en la expresión del transcripto *PPAR $\gamma$*  y luego de los 250 días de vida la

suplementación induciría un efecto en la expresión de *SREBP1*. Del mismo modo, Wang et al. (2009) midieron la expresión del transcrito *PPAR $\gamma$*  entre las cruzas Wagyu-Hereford y Piamontes-Hereford en terneros a los 3 y 7 meses de edad, encontrando diferencias recién a los 7 meses de vida, sugiriendo que la expresión de este transcrito acompaña la diferenciación de adipocitos. De manera similar a esto podría estar explicando lo hallado en el presente trabajo para el transcrito *SREBP1*. Contrariamente a esto, Achard et al. (2010) encontraron una mayor expresión del transcrito *SREBP1* en el genotipo Hereford-Hereford versus Hereford-Bonsmara en músculo de terneros al destete.

Independientemente del tratamiento nutricional, la expresión de ARNm de *SREBP1*, se encontró positivamente correlacionada con la expresión de *INSR*, esto concuerda con Bobard et al. (2004) en donde demostraron que *SREBP1* es un fuerte mediador tanto de la GH como de la insulina.

## 6. CONCLUSIONES

El peso vivo de los terneros al nacimiento y al destete, no fue afectado por la suplementación energético-proteica de sus madres durante el último mes de gestación.

El diámetro promedio y el número de fibras musculares totales por sección de área transversal, en los terneros al destete no fue afectado por la suplementación preparto.

Los terneros hijos de vacas suplementadas un mes preparto, presentaron menores niveles circulantes de IGF-I, sin embargo la concentración de insulina en sangre no fue afectada.

La abundancia de ARNm de *GHR*, *IGF1* y *INSR* en músculo no fue afectada por la suplementación preparto, sin embargo, los terneros hijos de vacas suplementadas presentaron menor expresión de *IGFBP3*.

La expresión de *PPAR-γ* en músculo fue mayor en los terneros hijos de vacas suplementadas un mes preparto, sin embargo la abundancia de ARNm de *SREBP1* no fue afectada por la suplementación.

Estos resultados sugieren que la suplementación durante la gestación en vacas multíparas durante el parto podría afectar el futuro desempeño productivo de la cría, mediante un efecto directo (durante la gestación) o indirecto (ej: cambios en la producción de leche). Sin embargo, los mecanismos moleculares a través de los cuales la nutrición de la madre influencia el desarrollo aún no se comprenden con exactitud. Se requiere ahondar y extender el estudio explorando la expresión de otros genes en este tejido que nos permitan explicar este fenómeno y estudiar el efecto de la suplementación en distintos momentos de la gestación.



## 7. RESUMEN

Se evaluó el efecto de la suplementación de vacas multíparas durante el último mes preparto sobre la expresión en músculo de genes asociados al eje somatotrófico (*GHR*= receptor de la hormona de crecimiento, *IGF1*= factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1, *IGFBP3*= proteína de unión IGF-3, *INSR* receptor de insulina) y la adipogénesis (*PPAR $\gamma$* =receptores activadores del proliferador de peroxisomas, *SREBP1*= proteína de unión al elemento regulador del estero1) en sus terneros. El experimento se llevó a cabo en la Unidad Experimental Palo a Pique (INIA, Treinta y Tres, Uruguay). Se utilizaron 10 terneros machos cruzas (Hereford/Angus), hijos de vacas multíparas asignadas a dos tratamientos nutricionales durante el último mes de gestación: testigo (pastoreo de campo nativo) y suplementación preparto (pastoreo de campo nativo + 1% del peso vivo de afrechillo de arroz integral). Se tomaron muestras del músculo *Semitendinoso* de los terneros al destete mediante biopsias musculares. Se midió la densidad y diámetro de las fibras musculares, previamente teñidas con Hemetoxilina y Eoina. Se extrajo el ARN total y se determinó la abundancia de ARNm mediante RT-PCR en tiempo real, usando el transcripto hipoxantina fosforibosiltransferasa (*HPRT*) como control endógeno. La expresión (número de moléculas) de los genes de interés en relación a la expresión de *HPRT* se analizó usando el procedimiento MIXED con un modelo que incluyó el efecto del tratamiento como efecto fijo y la edad y/o pesos de los terneros como covariable. La expresión muscular de ARNm de *GHR*, *IGF1* y *INSR* de los terneros no fue afectada ( $P \geq 0,331$ ) por la suplementación. Sin embargo, la expresión de *IGFBP3* fue menor en los hijos de vacas suplementadas durante el último mes de gestación ( $P = 0,022$ ). En relación a la adipogénesis, el nivel de *SREBP1* no fue afectado por el tratamiento ( $P = 0,806$ ) ni por la edad ( $P > 0,2$ ). Sin embargo, la expresión del transcripto *PPAR $\gamma$*  fue mayor ( $P = 0,044$ ) en terneros hijos de vacas suplementadas y la edad afectó ( $P = 0,013$ ) su expresión. El número aparente de fibras musculares y el diámetro no fue afectado ( $P \geq 0,12$ ) por la suplementación preparto en los terneros al destete. Estos resultados sugieren que la suplementación preparto, a través de mecanismos de regulación durante la etapa fetal o el amamantamiento podrían afectar el potencial del crecimiento y/o adipogénesis de los terneros.

Palabras clave: Expresión génica; Suplementación preparto; Fibras musculares.

## 8. SUMMARY

We examine the effect of one month prepartum supplementation of multiparous beef cows on muscle expression of genes associated with the somatotrophic axis (*GHR* = growth hormone receptor, *IGF1* = insulin-like growth factor type 1, *IGFBP3* = IGF binding protein-3, *INSR* = insulin receptor) and adipogenesis (*PPAR $\gamma$*  = peroxisome proliferator-activated receptors, *SREBP1* = protein binding of sterol regulatory element 1) of their calves at weaning. The experiment was conducted in the Palo a Pique experimental unit (INIA, Treinta y Tres, Uruguay). We used 10 crossbred male calves (Hereford / Angus) born to cows assigned to two nutritional treatments during the last month of pregnancy: control (grazing native pastures) and prepartum supplementation (grazing native pastures + 1% rice bran). Muscle biopsies (*Semitendinosus* muscle) samples were taken from calves at weaning. The number and diameter of muscle fibers was measured, previously stained with hematoxylin and eosin. Total RNA was extracted and mRNA abundance was determined by real time RT-PCR, using the hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT*) as endogenous control gene. The relative expression (number of molecules) of the target genes was analyzed using a MIXED model procedure including the fixed effect of treatment and age and / or weights of calves as covariates. Muscle mRNA expression of *GHR*, IGF-I and *INSR* was not affected ( $P \geq 0.331$ ) by cow prepartum supplementation. However, the expression of *IGFBP3* was less in the offspring of cows supplemented during the last month of gestation ( $P = 0.022$ ). Muscle mRNA expression of *SREBP1* was not affected by supplementation treatment ( $P = 0.806$ ) or age ( $P > 0.2$ ). However, the mRNA expression of *PPAR $\gamma$*  was greater ( $P = 0.044$ ) in offspring of supplemented cows, and age also affected ( $P = 0.013$ ) its expression. The calves apparent number of muscle fibers and the diameter weaning was not affected ( $P \geq 0.12$ ) by cow prepartum supplementation. These results suggest that cows prepartum supplementation, possibly through regulatory mechanisms during fetal growth, could affect the growth potential and / or adipogenesis of their calves.

Keywords: Gene expression; Prepartum supplementation; Muscle fibers.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. ACHARD, I.; MELO, C.; PIRELLI, J. A. 2010. Expresión en músculo de genes del eje somatotrófico y asociados a la adipogénesis en terneros Hereford puros y cruza Bonsmara-Hereford al nacimiento. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 52 p.
2. ALEXANDER, B. M.; HESS, B. W.; HIXON, D. L.; GARRETT, B. L.; RULE, D. C.; MCFARLAND, M.; BOTTGER, J. D.; SIMMS, D. D.; MOSS, G. E. 2002. Influence of fat supplementation on beef cow reproduction and calf performance. *J. Anim. Sci.* 18: 351–357.
3. ASTESSIANO, A. L.; CARRIQUIRY, M.; PEREZ-CLARIGET, R.; QUINTANS, G.; SOCA, P. 2011. Effects of a short-term increase in the nutritional plane before the mating period on metabolic and endocrine parameters, hepatic gene expression and reproduction in primiparous beef cows on grazing conditions. *J Anim. Phys. Anim. Nut.* 96: 535-544.
4. BARTON-DAVIS, E. R.; SHOTURMA, D.I.; SWEENEY, H. L. 1999. Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 167: 301–305.
5. BAYOL, S.; JONES, D.; GOLDSPINK, G.; NEIL, C. 2004. The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. *Stickland. Brit. J. Nutr.* 91: 331–339.
6. BECARD, D.; HAINAULT, I.; AZZOUT-MARNICHE, D.; BETTRY-COUSSOT, L.; FERRE, P.; FOUFELLE, F. 2001. Adenovirus-mediated overexpression of sterol regulatory element binding protein-1c mimics

insulin effects on hepatic gene expression and glucose homeostasis in diabetic mice diabetes. *Diabetes*. 50: 2425-2430.

7. BEDI, K. S.; BIRZGALIS, A. R.; MAHON, M.; SMART, J. L.; WAREHAM, A. C. 1982. Early life undernutrition in rats. 1. Quantitative histology of skeletal muscles from underfed young and refed adult animals. *Brit. J.Nutr.* 47: 417–431.
8. BEERMANN, D. H.; CASSENS, R. G.; HAUSMAN, G. J. 1978. A second look at fiber type differentiation in porcine skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* 46: 125-132.
9. BEERWINKLE, D. L.; MARCHELLO, J. A.; DRYDEN, F. D. 1979. Histological and histochemical characteristics of longissimus and semitendinosus muscle of feedlot and range steers. *J. Anim. Sci.* 48: 212 p.
10. BELLOWS, R. A.; SIMMS, D.D.; GRINGS, E.E.; PHELPS D.A.; BELLOWS, S.E.; BELLOWS, N.R.; SHORT, R.E.; FUSTON, R.N. AND GEARY, T.W. 1999. Effects of feeding supplemental fat during gestation on reproduction in primiparous beef heifers. *J. Anim. Sci.* 77: 236.
11. BERRETTA, E.; RISSO, D.; MONTOSI, F.; PIGURINA, G. 2000. Campos in Uruguay. In: Lemaire, G.; Hogdson, J.; de Moraes, A.; Nabinger, C.; Carvalho, PC d F. eds. *Grassland ecophysiology and grazing ecology*. New York, CABI. pp. 377-394.
12. BHASIN, S.; WOODHOUSE, L.; CASABURI,R.; SINGH, A. B.; BHASIN, D.; BERMAN, N.; CHEN, X.; YARASHESKI, K. E.; MAGLIANO, L.; DZEKY, L.; DZEKOY, J.; BROSS, L.; PHILLIPS, L.; SINHA-HIKIM,I.; SHEN, R.; STORER. T. W. 2001. Testosterone dose-response relationships in healthy young men. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281: 1172–1181.

13. BOBARD, A.; HAINAULT, I.; FERRE, P.; FOUFELLE, F.; BOSSARD, P. 2004. Differential regulation of sterol regulatory element-binding protein 1c Transcriptional activity by insulin and liver X receptor during liver development. *J. Biol. Chem.* 280: 199-206.
14. BREIER, B. H.; BASS, J. J.; BULTER, J. H.; GLUCKMAN, P. D. 1986. The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status on pulsatile release of growth hormone and circulating concentrations of insulin-like growth factor I. *J. Endoc.* 111: 209–215.
15. \_\_\_\_\_; GLUCKMAN, P. D.; BASS, J. J. 1988. The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status and oestradiol-17 beta on hepatic high- and low-affinity somatotrophic binding sites. *J. Endocr.* 116: 169–177.
16. BUONOMO, F. C.; BAILE, C. A. 1991. Influence of nutritional deprivation on insulin-like growth factor I, somatotrophin, and metabolic hormones in swine. *J. Anim. Sci.* 69: 755–760.
17. CAMPION, D.E. 1984. The muscle satellite cell; a review. *Int. Rev. Cytol.* 87:225-251.
18. CARRIQUIRY, M.; WEBER, W.J.; FAHRENKRUG, S.C. ; CROOKER, B.A. 2009. Hepatic gene expression in multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. *J. Dair. Sci.* 92: 4889 –4900.
19. CASTILLO, G.; HAUSER, S.; ROSENFELD, J. K.; SPIEGELMAN, B. M. 1999. Role and regulation of PPAR $\gamma$  during adipogenesis. *J. Anim. Sci.* 77: 9–15.
20. CATON, J. S.; HESS, B. W. 2010. Maternal plane of nutrition and impact on the offspring. In: Hess, B. W.; Delcurto, T.; Bowman, J. G. P. eds.

Impacts on fetal outcomes and postnatal offspring responses. Champaign, IL, American Society of Animal Science. pp. 134-148.

21. CHEN, R.; YIN, Y.; PAN, J.; GAO, Y.; Li, T. 2011. Expression profiling of IGFs and IGF receptors in piglets with intrauterine growth restriction. *Livest. Prod. Sci.* 136:72–75.
22. CLARKE, S. L.; ROBINSON, C. E.; GIMBLE, J. M. 1997. CAAT/ enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240: 99–103.
23. CLEMMONS, D. R.; SEEK, M.; UNDERWOOD, L. E. 1985. Supplemental essential amino acids augment the somatomedin C/insulin-like growth factor I response to refeeding after fasting. *Metab.* 34: 391–395.
24. \_\_\_\_\_. 2009. Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol. Metab.* 20: 349–356.
25. COFFEE, C. J. 1998. *Metabolism*. Madison, Connecticut, France Creek. cap. 13, pp. 187-199.
26. COSTELLO, P. M.; ROWLWRSON, A.; ASTAMAN, N. A.; ANTHONY, F. E. W.; SAYER, A. A. 2008. Peri-implantation and late gestation maternal undernutrition differentially affect fetal sheep skeletal muscle development. *J. Physiol.* 9: 2371–2379.
27. DAUNCEY, M. J.; BURTON, K. A.; WHITE, P.; HARRISON, A. P.; GILMOUR, R. S.; DUCHAMP, C.; CATTANEO, C. 1994. Nutritional regulation of growth hormone receptor gene expression. *FASEB J.* 8: 81–88.
28. \_\_\_\_\_.; GILMOUR, R. S. 1996. Regulatory factors in the control of muscle development. *Proc. Nutr. Soc.* 55: 543–559.

29. \_\_\_\_\_; KATSUMATA, M.; WHITE, P. 2004. Muscle development of livestock animals; physiology, genetics, and meat quality. s.l., CAB International. cap. 5, pp. 104-119.
30. DAVIS, P. J.; TILLMANN, H. C.; DAVIS, F. B.; WEHLING, M. 2002. Comparison of the mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone and steroid hormones. *J. Endoc. Invest.* 25: 377–388.
31. DAYTON, W. R.; WHITE, M. E. 2008. Cellular and molecular regulation of muscle growth and development in meat animals. *J. Anim. Sci.* 86: 217-225.
32. DILS, R. R.; KNUDSEN, J. 1980. Milk fat composition and biosynthesis in non-ruminants and ruminants. *Biochem. Soc. Trans.* 8: 292 -294
33. DØRUP, I.; FLYVBJERG, A.; EVERTS, M. E.; CLAUSEN, T. 1991. Role of insulin-like growth factor I and growth hormone in growth inhibition induced by magnesium and zinc deficiencies. *Brit. J. Nutr.* 66: 505–521.
34. DRACKLEY, J. K.; OVERTON, T. R.; DOUGLAS, G. N. 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient. period. *J Dairy Sci.* 84: 100-112.
35. DU, M.; TONG, J.; ZHAO, J.; UNDERWOOD, K. R.; ZHU, M.; FORD, S. P.; NATHANIELSZ, P. W. 2009. Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *J. Anim. Sci.* 88: 32.
36. DUAN, C.; XU, N. Y.; CHEN, X. Q.; DU, J. Z. 2004. Intermittent hypoxia causes a suppressed pituitary growth hormone through somatostatin. *Neuroendonol. Lett.* 25: 253-260.
37. \_\_\_\_\_; REN, H.; GAO, S. 2010. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: Roles in skeletal muscle growth and differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 167: 344–351.

38. DWYER, C. M.; STICKLAND, N. C. 1991. Sources of variation in myofibre number within and between litters of pigs. *Anim. Prod.* 52: 527–533.
39. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; FLETCHER, J. M. 1994. The influence of maternal nutrition on muscle fibre number development in the porcine fetus and on subsequent postnatal growth. *J. Anim. Sci.* 72: 911–917.
40. \_\_\_\_\_.; MADGWICK, A. J.; STICKLAND, N. C.; WARD, S. S. 1995. Effect of maternal undernutrition in early gestation on the development of fetal myofibres in the guinea-pig. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 1285–1292.
41. EWTON, D. Z.; FLORINI, J. R. 1995. IGF binding proteins -4, -5 and -6 may play specialized roles during L6 myoblast proliferation and differentiation. *J. Endocrinol.* 144: 539–553.
42. FAHEY, A. J.; BRAMELD, J. M.; PARR, T.; BUTERY, P. J. 2005. Ontogeny of factors associated with proliferation and differentiation of muscle in the ovine fetus. *J. Anim. Sci.* 83: 2330-2338.
43. FAJAS, L.; SCHOONJANS, K.; GELMAN, L.; KIM, J. B.; NAJIB, J.; MARTIN, G.; FRUCHART, J. C.; BRIGGS, M.; SPIEGELMAN, B. M.; AUWERX, J. 1999. Regulation of PPAR<sub>α</sub> expression by ADD-1/SREBP-1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Molec. Cell. Biol. J Physiol.* 19: 5495–5503.
44. FAUST, I. M.; JOHNSON, P. R.; STERN, J. S.; HIRSTH, J. 1978. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats; a new model of obesity. *Am. J. Physiol.* 235: 279-286.
45. FEVE, B. 2005. Adipogenesis; cellular and molecular aspects. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 19: 483-499.
46. FLORINI, J. R. 1987. Hormonal control of muscle growth. *Msc. and Nrv.* 10: 577–598.



47. \_\_\_\_\_.; EWTON, D. Z.; COOLICAN, S. A. 1996. Growth hormone and the insulinlike growth factor system in myogenesis. *Endocrinol. Rev.* 17: 481–517.
48. FORETZ, M.; GUICHARD, C.; FERRE, P.; FOUFELLE, F. 1999. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 12737-12742.
49. FREETLY, H. C.; FERRELL, C. L.; JENKINS, T. G. 2000. Timing of realimentation of mature cows that were feed-restricted during pregnancy influences calf birth weights and growth rates. *J. Anim. Sci.* 78: 2790-2796.
50. FROHNERT, B. I.; HUI, T. Y.; BERNLOHR D. A. 1999. Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. *J. Biol. Chem.* 274: 3970-3977.
51. FUNSTON, R. N.; MARTIN, J. L.; ADAMS, D. C.; Larson, D. M. 2010. Winter grazing system and supplementation of beef cows during late gestation influence heifer progeny. *J. Anim. Sci.* 88: 4094-4101.
52. GAYAN-RAMIREZ, G.; ROLLIER, H.; VANDERHOYDONC, R.; VERHOEVEN, G.; GOSSELINK, R.; DECRAMER, M. 2000. Nandrolone decanoate does not enhance training effects but increases IGF-I mRNA in rat diaphragm. *J. Appl. Physiol.* 88: 26–34.
53. GERBENS, F. 2004. Muscle development of livestock animals; physiology, genetics, and meat quality. s.l., CAB International. cap. 16, pp. 343-356.
54. GERRARD, D. E.; OKAMURA, C. S.; RANALLETTA, M. A. M.; GRANT, A. L.; 1997. Developmental expression and location of IGF-I and IGFII mRNA and protein in skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* 76: 1004–1011.

55. GNANALINGHAM, M. G.; MOSTYN, A. M.; SYMONDS, E.; STEPHENSON, T. 2005. Ontogeny and nutritional programming of adiposity in sheep; 40 potential role of glucocorticoid action and uncoupling protein-2. *Am. J. Physiol.* 289: 1407-1415.
56. GONDRET, F.; MOUROT, J.; BONNEAU, M. 1998. Comparison of intramuscular adipose tissue, cellularity in muscles differing in their lipid content and fibre type composition during rabbit growth. *Live. Prod. Sci.* 54: 1–10.
57. GREENWOOD, P. L.; SLEPETIS, R. M.; HERMANSON, J. W.; BELL, A. W. 1999. Intrauterine growth retardation is associated with reduced cell cycle activity, but not myofibre number, in ovine fetal muscle. *Reprod. Fertil. Dev.* 11: 281-291.
58. GRIGERA, J. M.; RERARTE, D.; SANTINI, F. J. 2003. Algunos aspectos sobre la calidad de las carnes bovinas asociadas a los sistemas de producción. *In: Jornada de Actualización Ganadera (1o., 2003, Balcarce). Memorias. Buenos Aires, Ipcva. pp. 11-18.*
59. GROBET, L.; MARTIN, L. J.; PONCELET, D.; PIROTTIN, D.; BROUWERS, B.; RIQUET, J.; SCHOEBERLEIN, A.; DUNNER, S.; MENISSIER, F.; MASSABANDA, J.; FRIES, R.; HANSET, R.; Georges, M. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nat. Genet.* 17: 71–74.
60. GULER, H. P., ZAPF, J.; SCHMID, C.; FROESCH, E. R. 1989. Insulinlike growth factors I and II in healthy man. *Acta Endocrinol. (Copenh.).* 121: 753–758.
61. HANCOCK, D. L.; WAGNER, J. F.; ANDERSON, D. B. 1991. Effects of estrogens and androgens on animal growth. *Growth regulation in Farm Anim. Adv. Meat Res.* 7: 25.

62. HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.* 91: 534–551.
63. HAYDEN, J. M.; WILLIAMS, J. E.; COLLIER, L. J. 1993. Plasma growth hormone, insulin-like growth factor, insulin, and thyroid hormone association with body protein and fat accretion in steers undergoing compensatory gain after dietary energy restriction. *J. Anim. Sci.* 71: 3327–3338.
64. HEGARTY, P. V. G. 1971. Muscle fibre growth and development. *J. Anat.* 24: 319 p.
65. HIZUKA, N.; TAKANO, K.; SHIZUME, K.; ASAKAWA, K.; MIYAKAWA, M.; TAKANA, I.; HORIKAWA, R. 1986. Insulin-like growth factor I stimulates growth in normal growing rats. *European J. Pharm.* 125: 143–146.
66. HOOD, R. L.; ALLEN, C. E. 1973. Cellularity of bovine adipose tissue. *J. Lipid Res.* 14: 605–610.
67. HOPPENER, J. W.; PAGTER-HOLTHUIZEN, P.; GEURTS VAN KESSEL, A. H.; JANSEN, M.; KITTUR, S. D.; ANTONARAKIS, S. E.; LIPS, C. J.; SUSSENBACH, J. S. 1985. The human gene encoding insulin-like growth factor I is located on chromosome 12. *Hum. Genet.* 69: 60-157.
68. HORTON, J. D.; BASHMAKOV, Y.; SHIMOMURA, I.; SHIMANO, H. 1998. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 5987-5992.
69. HOUBA, P. H. J.; TE PAS, M. F. W. 2004. The muscle regulatory factors gene family in relation to meat production. s.l., CAB International. cap.10, pp. 201-218.

70. HOVENIER, R. E.; KANIS, E.; VAN ASSELDONK, T.; WESTERINK, N. G. 1993. Breeding for pig meat quality in halothane negative populations a review. *Pig News and Info*. 14: 17–25.
71. HWANG, C. S.; LOFTUS, T. M.; MANDRUP, S.; LANE, D. 1997. Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annual Rev. Cell. Develop. Biol.* 13: 231–259.
72. INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION AGROPECUARIA (INIA). 2008. Programa nacional de investigación producción de carne y lana, en el contexto del INIA. (en línea). Montevideo. 10 p. Consultado 25 oct. 2011. Disponible en <http://www.inia.org.uy/online/site/315838I1.php>.
73. ISLEY, W. L.; UNDERWOOD, L. E.; CLEMMONS, D. R. 1984. Changes in plasma somatomedin-C in response to ingestion of diets with variable protein and energy content. *J Parent. Ent. Nut.* 8: 407–411.
74. JACOBS, S. C.; WOKKE, J. H.; BAR, P. R.; BOOTSMA, A. L. 1996. Satellite cell activation after muscle damage in young and adult rats. *Anat. Rec.* 242: 329–336.
75. JOHNSON, B. J.; AANDERSON, P. T.; MEISKE, J. C.; DAYTON, W. R. 1996. Effect of a combined trenbolone acetate and estradiol implant on steroid hormone levels, feedlot performance, carcass characteristics and carcass composition of feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 74: 363–371.
76. \_\_\_\_\_; HALSTEAD, N.; WHITE, M. E.; HATHAWAY, M. R.; DAYTON, W. R. 1998. Activation state of muscle satellite cells isolated from steers implanted with a combined trenbolone acetate and estradiol implant. *J. Anim. Sci.* 76: 2779–2786.
77. JOHNSTON, D. M.; STEWART, D. F.; JAMES, W. G. M. 1975. Beef muscle fiber types effect of breed and time on feed on the size and distribution of beef muscle fiber types. *J. Anim. Sci.* 40: 613-620.

78. JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrinol. Review.* 16: 3–34.
79. JOUBERT, D. M. 1956. Analysis of factors influencing postnatal growth and development of muscle fibre. *J. Agric. Sci. Camb.* 47: 59-102.
80. KAMANGA-SOLLO, E.; PAMPUSCH, M. S.; WHITE, M. E.; DAYTON, W. R. 2003. Role of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 in TGF- $\beta$ - and GDF-8 (myostatin)-induced suppression of proliferation in porcine embryonic myogenic cell cultures. *J. Cell. Physiol.* 197: 225–231.
81. KAMBADUR, R.; BISHOP, A.; SENNA, M.; MCCROSKERY, M.; SHARMA, M. 2004. Muscle development of livestock animals; physiology, genetics, and meat quality. s.l., CAB International. cap. 14, pp.104-119.
82. KATSUMATA, M.; CATTANEO, D.; WHITE, P.; BURTON, K. A.; DAUNCEY, M. J. 2000. Growth hormone receptor gene expression in porcine skeletal and cardiac muscles is selectively regulated by postnatal undernutrition. *J. Nutr.* 130: 2482–2488.
83. KIM, J.B.; WRIGHT, H.M.; WRIGHT, M.; SPIEGELMAN, B.M. 1998. ADD1/SREBP1 activates PPAR $\gamma$  through the production of endogenous ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 4333–4337.
84. LAMMOGLIA, M. A.; WILLARD, S. T.; OLDHAM, J. R.; RANDEL, R. D. 1996. Effects of dietary fat and season on steroid hormonal profiles before parturition and on hormonal, cholesterol; triglycerides, follicular patterns; and postpartum reproduction in Brahman cows. *J. Anim. Sci.* 74: 2253–2262.

85. LANE, M. D.; TANG, Q. Q.; JIANG, M. S. 1999. The adipocyte differentiation program; repression/ derepression of the C/EBP $\alpha$  gene. *J Anim. Sci.* 77: 23–32.
86. LAPORTA, J. 2011. Aspectos moleculares de los mecanismos involucrados en la interacción nutrición-reproducción en bovinos de carne de diferente tipo genético. Tesis Magister en Ciencias Agrarias Opción Ciencias Animales. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 115 p.
87. LARSON, D. M., MARTIN, J. L.; ADSMS, D. C.; FUNSTON, R. N. 2009. Winter grazing system and supplementation during late gestation influence performance of beef cows and steer progeny. *J Anim Sci.* 87: 1147-1155.
88. LAYMAN, D. K.; SWAN, P. B.; HEGARTY, P. V. 1981. The effect of acute dietary restriction on muscle fibre number in weanling rats. *Br. J. Nutr.* 45: 475-481.
89. LAZAR, M. A. 1999. PPAR $\gamma$  in adipocyte differentiation. *J. Anim. Sci.* 77: 16–22.
90. LEE, Y. B.; KAUFMAN, R. G.; GRUMMER, R. H. 1973. Effect of early nutrition on the development of adipose tissue in the pig. I. Age constant basis. II. Weight constant basis. *J. Anim. Sci.* 37: 1312–1325.
91. LEHNERT, S. A.; REVERTER, A.; BRYNE, K. A.; WANG, Y. H.; NATTRESS, G. S.; HUDSON, N. J.; GREENWOOD, P. L. 2007. Gene expression studies of developing bovine longissimus muscle from two different beef cattle breeds. *BMC Dev. Biol.* 7: 95.
92. LE ROITH, D.; BONDY, C.; YAKER, S.; LIU, J. L.; BUTLER, A.; 2001. The somatomedin hypothesis. *Endocrine Rev.* 22: 53–74.

93. LEWIS, A. J.; WESTER, T. J.; BURRIN, D. G.; DAUNCEY, M. J. 2000. Exogenous growth hormone induces somatotrophic gene expression in neonatal liver and skeletal muscle. *Am. J. of Physiol.* 278: R838–844.
94. \_\_\_\_\_.; HORVITZ, G. D.; CLEMMONS, D. R.; FOURNIER, M. 2002. Role of IGF-I and IGF-binding proteins within diaphragm muscle in modulating the effects of nandrolone. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282: 483–490.
95. MCCOARD, S. A.; MCNABB, W. C.; PETERSON, S. W.; MCCUCHEON, S. N. HARRIS, P. M. 2000. Muscle growth, cell number, type and morphometry in single and twin fetal lambs during mid to late gestation. *Reprod. Fertil. Dev.* 12: 319-327.
96. MCPHERRON, A. C.; LAWLER, A. M.; LEE, S. J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature.* 387: 83–90.
97. MCROSKERY, S.; THOMAS, M.; MAXWELL, L.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. 2003. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J. Cell. Biol.* 162: 1135–1147.
98. MAES, M.; UNDERWOOD, L. E.; KETELSLERGERS, J. M.; 1984. Low serum somatomedin-C in protein deficiency: relationship with changes in liver somatogenic and lactogenic binding sites. *Molec. Cell. Endocrinol.* 37: 301–309.
99. MANN, N. J.; E. N. PONNAMPALAM, E. N.; YEP, Y.; A. J. SINCLAIR, A. J. 2003. Feeding regimes affect fatty acid composition in Australian beef cattle. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 12: 38.
100. MARTIN, J. L.; VONNAHME, K. A.; ADAMS, D. C.; LARDY, G. P.; FUNSTON, R. N. 2008. Effects of dam nutrition on growth and reproductive performance of heifer calves. *J. Anim. Sci.* 85: 841-847.

101. MATSUMURA, Y.; DOMENEKI, M.; SUGAHARA, K.; KUBO, T.; ROBERTS, C. T.; LEROITH, D.; KATO, H. 1996. Nutritional regulation of insulinlike growth factor-I receptor mRNA levels in growing chickens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 979–982.
102. MERSMANN, H. J. 1991. Regulation of adipose tissue metabolism and accretion in mammals raised for meat production. *In*: Dutson, T.R. ed. *Growth regulation in farm animals; advances in meat research*. London, Elsevier. pp. 135–168.
103. MICKE, G. C.; SULLIVAN, T. M.; MCMILLEN, I. C.; GENTILI, S.; PERRY, V. E. A. 2011. Protein intake during gestation affects postnatal bovine skeletal muscle growth and relative expression of IGF1, IGF1R, IGF2 and IGF2R. *Mol. Cell. Endocrinol.* 332: 234–241.
104. MIJAN DEL LA TORRE, A. 2004. *Nutrición y metabolismo trastornos de la conducta alimentaria*. Barcelona, Glosa. 521 p.
105. MOSS, F. P.; LEBLOND, C. P. 1971. Satellite cells as the source of nuclei in muscle of growing rats. *Anat. Rec.* 170: 421–436.
106. MUHLHAUSLER, B. S.; DUFFIELD, J. A.; MCMILLEN, I. C. 2007. Increased maternal nutrition stimulates peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  44 (PPAR $\gamma$ ), adiponectin and leptin mRNA expression in adipose tissue before birth. *Endocrinology.* 148: 878-885.
107. NATIONAL RESERCH COUNCIL (NRC). 1985. *Nutrient requirements of sheep*. 6th. ed. Washington, D.C., National Academy Press. 99 p.
108. \_\_\_\_\_. 2000. *Nutrient requirements of beef cattle*. 7th. ed. Washington, D.C., National Academy Press. 232 p.
109. ORCASBERRO, R. 1991. Estado corporal, control del amamantamiento y performance reproductiva de rodeos de cría. *In*: Carámbula, M.; Vaz Martins, D.; Indarte, E. eds. *Pasturas y producción animal en áreas de*



ganadería extensiva. Montevideo, INIA. pp. 158-169 (Serie Técnica no. 13).

110. OSTERC, J. 1974. Diameter and number of muscle fibers. in musculus longissimus dorsi in connection with production properties of some cattle breeds. PhD Thesis. Ljubljana, Eslovenia. University of Kmetistvo. pp. 1-67.
111. PEREYRA, F.; LAPORTA, J.; ASTESSIANO, A. L.; SCARSI, A.; PÉREZ-CLARIGET, R.; QUINTANS, G.; CARRIQUIRY, M. 2009. Expresión hepática de genes asociados al eje somatotrófico en terneros hijos de vacas suplementadas durante el último mes de gestación; datos preliminares. *J. Vet.* 3:10-16.
112. PHILIPPOU, A.; HALAPAS, A.; MARIDAKI, M.; KOUTSILIERIS, M. 2007. Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 7: 208–218.
113. PONNAMPALAM, E. N.; MNN, N. J.; SINCLAIR, A. J. 2006. Effect of feeding systems on omega-3 fatty acids, conjugated linoleic acid and trans fatty acids in Australian beef cuts; potential impact on human health. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 15: 21-29.
114. PRINS, J. B.; O'RAHILLY, S. 1997. Regulation of adipose cell number in man. *Clin. Sci.* 92: 3–11.
115. REHFELDT, C.; BUNGER, L.; DIETL, G.; FIEDLER, I.; WEGNER, J. 1991. Zur erblichkeit von muskelstrukturmerkmalen und ihren genetisch begründeten beziehungen zu wachstum und belastbarkeit bei labormäusen. *Arch. Anim. Breed.* 31: 185-195.

116. \_\_\_\_\_.; FIEDLER, I.; WEIKARD, R.; KANITZ, E.; ENDER, K. 1993. It is possible to increase skeletal muscle fibre number in utero. *Biochem. Rep.* 13: 213–220.
117. \_\_\_\_\_.; STICKLAND, N. C.; FIEDLER, I.; WEGNER, J. 1999. Environmental and genetic factors as sources of variation in skeletal muscle fibre number. *B. App. Myology.* 9: 237–255.
118. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; NEIL C. 2004. Muscle development of livestock animals; physiology, genetics, and meat quality. s.l., CAB International. cap. 1, pp. 2-30.
119. RENAVILLE, B.; GLENN, K. L.; MOTE, B. E.; FAN, B.; STALDER, K. J.; ROTHSCHILD, M. F. 2010. SREBP pathway genes as candidates markers in country ham production. *Ital. J. Anim. Sci.* 9: 7.
120. ROBINSON, J. J.; SINCLAIR, K. D.; MCEVOY, T. G. 1999. Nutritional effects on fetal growth. *J. Anim. Sci.* 68: 315–331.
121. ROSEN, E. D.; HSU, C. H.; WANG, X.; SAKAI, S.; FREEMAN, M. W.; GONZALEZ, F. J.; SPIEGELMAN. B. M. 2002. C/EBP  $\gamma$  induces adipogenesis through PPAR  $\gamma$ : A unified pathway. *Genes Dev.* 16: 22-26.
122. \_\_\_\_\_.; MACDOUGALD, O. A. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 885-896.
123. RUSSELL, R. G.; OTERUELO, F. T. 1981. An ultrastructural study of the differentiation of skeletal muscle in the bovine fetus. *Anat. Embryol.* 162: 403-417.
124. SADKOWSKI, T.; JANK, M.; ZWIERZCHOWSKI, L.; OPRZADEK, J.; MOTYL, J. 2009. Comparison of skeletal muscle transcriptional profiles in dairy and beef breeds bulls. *J. Appl. Genet.* 50: 109–123.

125. SCHADEREIT, R.; KLEIN, M.; REHFELDT, C.; KREIENBRING, F.; KRAWIELITZKI, K. 1995. Influence of nutrient restriction and realimentation on protein and energy metabolism, organ weights, and muscle structure in growing rats. *J. Anim. Physiol.* 74: 253–268.
126. SCHNEIDER, A.; MACHADO, L. F.; TEXEIRA, L.; PALUDO, G. R.; BURKERT, A.; LAURINO, N. J.; CORREA, M. N. 2010. Insulin-like growth factor and growth hormone receptor in postpartum lactating beef cows. *Pesq. Agropec. Bras.* 8: 925-931.
127. SHIMANO, H.; HORTON, J. D.; SHIMOMURA, I.; HAMMER, R. E.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. 1997. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Investig.* 99: 846 -854.
128. SINHA-HIKIM, I.; ARTAZA, J.; WOODHOUSE, L.; GONZALES-CADAVIS, N.; SINGH, A. B.; LEE, M. I.; STORER, W. T., CASABURI, R.; SHEN, R.; BHASIN, S. 2002. Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283: 154–164.
129. \_\_\_\_\_; ROTH, S. M.; LEE, M. I.; BHASIN, S. 2003. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285: 197–205.
130. SJOGREN, K.; LIU, J. L.; BLAD, K. 1999 Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 7088–7092.
131. SMALL, W. T.; PAISLEY, S. I.; HESS, B. W.; LAKE, S. L.; SCHOLLJEGERDES, E. J.; REED, T. A.; BELDEN, E. L.; BARTLE, S.

2004. Supplemental fat in limit-fed, high grain prepartum diets of beef cows: Effects on cow weight gain, reproduction, and calf health, immunity, and performance. *J. Anim. Sci.* 55: 45–52.
132. SMAS, C. M.; SUL, H. S. 1995. Control of adipocyte differentiation. *Biochem. J.* 309: 697–710.
133. SPITZER, J. C.; MORRISON, D. G.; WETTEMANN, R. P.; AND FAULKNER, L. C. 1995. Reproductive responses and calf birth and weaning weights as affected by body condition at parturition and postpartum weight gain in primiparous beef cows. *J. Anim. Sci.* 73: 1251-1257.
134. STALKER, A. L.; ADAMS, D. C.; KLOPFENSTEIN, T. J.; FEUZ, D. M.; FUNSTON, R. N. 2006. Effects of pre- and postweaning nutrition on reproduction in spring calving cows and calf feedlot performance. *J. Anim. Sci.* 84: 2582-2589.
135. STANNARD, S. R.; JOHNSON, N. A. 2004. Insulin resistance and elevated triglyceride in muscle; more important for survival than "Thrifty" genes. *J. Physiol.* 554: 595-607.
136. STICKLAND, N. C.; WIDDOWSON, E. M.; GOLDSPINK, G. 1975. Effects of severe energy and protein deficiencies on the fibres and nuclei in skeletal muscle of pigs. *British J. Nutr.* 34: 421–428.
137. \_\_\_\_\_. 1978. A quantitative study of muscle development in the bovine foetus (*bos indicus*). *Anat. Histol. Embryol.* 7: 193-205.
138. TE PAS, M. F. W.; EVERTS, M. E.; HAAGSMAN, H. P. 2004. Muscle development of livestock animals; physiology, genetics, and meat quality. s.l., CAB International. 411 p.

139. THISSEN, J. P.; KETELSEGERS, J. M.; UNDERWOOD, L. E. 1994. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocrinol. Rev.* 15: 80–101.
140. THOMAS, G. B.; MERCER, J. E.; KARALIS, T.; RAO, A.; CUMMINGS, J. T.; CLARKE, I. J. 1990. Effect of restricted feeding on the concentrations of Growth Hormone (GH), Gonadotropins, and Prolactin (PRL) in plasma, and on the amounts of messenger ribonucleic acid for GH, gonadotropin subunits, and PRL in the pituitary glands of adult ovariectomized ewes. *Endocrinology.* 126: 1361–1367.
141. TILLEY, R. E.; MCNEIL, C. J.; ASHWORTH, C. J.; PAGE, K. R.; MCARDLE, H. J. 2007. Altered muscle development and expression of the insulin-like growth factor system in growth retarded fetal pigs. *Domest. Anim. Endocrinol.* 32: 167–177.
142. TONG, J.; YAN, X.; ZHU, M. J.; FORD, S. P.; NATHANIELSZ, P. W.; DU M. 2009. Maternal obesity downregulates myogenesis and  $\beta$ -catenin signaling in fetal skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296: 917-924.
143. URUGUAY. INSTITUTO DE NACIONAL DE CARNE. 2010. Anuario estadístico INAC 2010. Montevideo. 120 p.
144. \_\_\_\_\_. MINISTERIO DE GANADERIA AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCION DE INVESTIGACION DE ESTADISTICA AGROPECUARIA. 2010. Anuario estadístico 2009. (en línea). Montevideo. Consultado 15 oct. 2011. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/Diea/>.
145. VERBEKE, W.; VAN OECKEL, M. J.; WARNANTS, N.; VIAENE, J.; BOUCQUE, C. V. 1999. Consumer perceptions, facts and possibilities to

improve acceptability of health and sensory characteristics of pork. *Meat Sci.* 53: 77–99.

146. WANG, Y. H.; BOWER, N. Y.; REVERTER, A.; TAN, S. H.; DE JAGER, N.; WANG, R.; MCWILLIMAM, S. M.; CAFE, L. M.; GREENWOOD, P. L.; LEHNERT, S. A. 2009. Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. *J Anim. Sci.* 87: 119-130.
147. WARD, S. S.; STICKLAND, N. C. 1991. Why are slow and fast muscles differentially affected during prenatal under nutrition? *Musc. Nerve.* 14: 259–267.
148. WEGNER, J.; ALBRECHT, E.; ENDER, K. 1997. Morphological aspects of intramuscular fat deposition in cattle. *Arch. Tierzucht.* 37: 599–604.
149. WELLER, P. A.; DAUNCEY, M. J.; BATES, P.C.; BRAMELD, J. M.; BUTTERY, P. J.; GILMOUR, R. S. 1994. Regulation of porcine insulin-like growth factor I and growth hormone receptor Mrna expression by energy status. *American J. Phys.* 266: 776–785.
150. WOOD, A. W.; DUAM, C.; BERN, H. A.; 2005. Insulin-like growth factor signaling in Wsh. *Int. Rev. Cytol.* 243: 215–285.
151. WU, Z.; ROSEN, E. D.; BRUN, R.; HAUSER, S.; ADELMANT, G.; TROY, A. E.; MCKEON, C.; DARLINGTON, G. J.; SPIEGELMAN, B. M. 1999. Cross-regulation of C/EBP  $\gamma$  and PPAR  $\gamma$  controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell.* 3: 151-158.
152. YAKAR, S.; LIU, J. L.; STANNARD, B.; BUTLER, A.; ACCILI, D.; SAUER, B.; LEROITH, D. 1999. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 7324–7329.

153. YU, H.; LIU, B. H.; MERSMANN, H. J.; DING, S. T. 2006. Porcine peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces trans-differentiation of myocytes into adipocytes. *J Anim Sci.* 84: 2655-2665.
154. ZHU, M. J.; FORD, S. P.; HESS, B. W.; MEANS, W. J.; NATHANIELZ, P. W.; Du, M. 2004. Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biol. Reprod.* 71: 1968- 1973.
155. \_\_\_\_\_.;\_\_\_\_\_. 2006. Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *J. Physiol.* 575: 241-250.

## 9. ANEXOS

### 9.1 DISEÑO EXPERIMENTAL, ANIMALES Y TRATAMIENTOS

ID	F. Nacim.	Trat <sup>1</sup>	Bloque	PN	EDAD	PD	BIOTIPO
8235	15/09/2008	Sup	5	28	198	150	H-AH
8264	24/09/2008	Test	5	46	189	192	H
8240	17/09/2008	Test	4	43	196	200	H-AH
8278	29/09/2008	Test	4	40	184	180	AH
8277	28/09/2008	Sup	3	49	185	201	AH
8296	06/10/2008	Test	3	38	177	177,5	H
8256	23/09/2008	Sup	2	33	190	166,5	H-AH
8268	25/09/2008	Test	2	44	188	182	H-AH
8280	30/09/2008	Sup	1	46	183	203	AH
8299	07/10/2008	Test	1	35	176	176	A-HAH

<sup>1</sup>Tratamiento nutricional; SUP: terneros hijos de vacas pastoreando campo nativo suplementadas a 1% del PV con afrechillo de arroz durante el último mes de gestación (n = 5), TEST: hijos de vacas pastoreando campo nativo (testigo, n = 5).



## 9.2 PROTOCOLO PARA BIOPSIAS DE TEJIDO MUSCULAR EN BOVINOS

**Objetivo:** describir el procedimiento de obtención y procesamiento de las muestras de tejido muscular, las cuales serán usadas para posteriores análisis tanto histológicos (determinación de número y diámetro de fibras musculares, y número de núcleos en cada una de ellas mediante observación con microscopio óptico) como genéticos relacionados al eje GH-IGF.

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

### **Materiales y métodos:**

#### **Preparación del animal:**

##### **Materiales:**

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

##### **Técnica:**

- Sujeción apropiada del animal a intervenir.
- Lavado de la zona a incidir (región posterior del miembro trasero izquierdo sobre el músculo Semitendinoso, a 6 cm. distal de la tuberosidad isquiática y a 1,5 cm. de los bordes del músculo) con detergente y enjuagar.
- Recorte del pelo y depilación del área de incisión con afeitadora.
- Desinfección del área con alcohol 70 y yodo mediante torundas.

-Inyección de 4mL de Lidocaína al 2% percutánea en abanico y en profundidad en la zona a incidir, esperar aproximadamente 5 minutos para que el anestésico haga efecto

### **Obtención de la muestra:**

#### **Materiales:**

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

#### **Técnica:**

-Realizar una incisión de unos 4cm con bisturí en la zona posterior del músculo semitendinoso a 6 cm. de la tuberosidad isquiática a 1,5 cm. de los bordes del músculo.

-Al visualizar el tejido muscular tomar una porción de unos 2 x 1 x 1cm, de largo, ancho y profundidad respectivamente, con una pinza dientes de ratón e incidir con bisturí obteniendo una fracción rectangular del músculo con un peso aproximado de 2gr.

- Se limpia la zona con torunda, tratando de retirar toda la sangre de la herida,

-Se procede a cerrar la herida con la aplicación de gotita autoadhesiva y se desinfecta con yodóforo (mediante torundas) y luego se aplica un antimiasico cicatrizante (baterplata o similar) en spray a no menos de 15cm de la herida y de manera que cubra toda la zona.

-Finalmente se libera al animal, vigilando que la herida no se abriera al momento de incorporarse el ternero.

### **Procesamiento de la muestra:**

#### **Materiales:**

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

#### **Técnica:**

Una vez obtenida la muestra se lavará en un recipiente con suero fisiológico, se escurrirá en el borde del mismo y se destinará una porción de ésta (1x1cm aprox) para el

estudio histológico, para el cual se deberá tener la precaución que el trozo a emplearse no haya sido alterado por el uso de las pinzas y se lo colocará en un tubo de 5mL con formol buffer al 4%. Otra porción de la muestra se colocará en un tubo eppendorf para su conservación en nitrógeno líquido y posterior análisis.

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

### 9.3 PROTOCOLO PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

#### **Procesamiento histológico de tejido muscular:**

- 1) En primer lugar deben sacarse las muestras de los recipientes con formol y realizar un corte con hoja de gillete de unos 5mm de espesor de las mismas. Debe tenerse en cuenta que es deseable obtener un trozo con la mayor superficie de corte posible. En este punto es importante utilizar guantes para manejar las muestras, así como pinzas para su correcta manipulación.
- 2) 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)
- 3) 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 horas para su lavado, retirando así el formol de las mismas evitando residuos como pigmentos fenólicos que impiden una buena coloración posterior.
- 4) Deshidratado de las muestras (dentro de los cassetes): Consiste en quitar el agua de las muestras y sustituirla paulatinamente con alcohol etílico. Se realizan tres baños en alcoholes. El primero en alcohol 70, consiguiendo la concentración del mismo con una mezcla de alcohol comercial y agua hasta que el marque la concentración deseada. En este punto se puede detener el procesamiento hasta que se desee reanudarlo o bien hacer un baño de 40 minutos. El mismo se realiza en un frasco de vidrio con tapa.

Luego pasan a otro frasco con alcohol 95 donde permanecerán 40 minutos, una vez transcurrido este tiempo el alcohol es retirado del frasco y vuelto a poner en

su recipiente y el frasco de las muestras es rellenado con alcohol 100, donde permanecerán una hora.

5) Una vez culminado el último baño en alcohol, 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.

6) Parafinado:

a. Colocar el frasco con cloroformo conteniendo los cassettes con las muestras en la campana para retirar las muestras y trabajar con pinza y guantes.

b. Ir retirando las muestras en grupos de 3

c. 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.

d. Sacar las primeras 3 muestras y colocarlas ordenadas en la primer línea de 3 recipientes de parafina. Dejarlas allí 20 minutos

e. Transcurridos los 20 minutos 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 minutos.

f. 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 minutos.

g. Una vez que las muestras han pasado por los 3 baños de 20 minutos 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, con el vacío hacia arriba (de los que se encontraban en el frasco con parafina caliente).

- h. Se colocan sobre placas de vidrio debidamente identificados.
  - i. Se coloca sobre la muestra hasta cubrir el borde del recipiente parafina limpia, y por encima se coloca Una vez que se solidificó la parafina se desmoldan los bloques utilizando un cuchillo haciendo presión sobre los bordes de los moldes metálicos.
- 7) Preparación de las láminas:
- a. Desengrasado: se sumergen las láminas en alcohol-eter y dejarlas allí por 5 minutos. trabajar bajo la campana sacando las láminas con una pinza y limpiándolas de a una con un trapo limpio.
  - b. Cargar las láminas en zig-zag en cajas de vidrio o plástico sin fondo ranuradas
  - c. Pasar por 4 baños:
    - i. El primero de 22 segundos en una mezcla de acetona con silano (1mL de silano cada 50mL de acetona comercial)
    - ii. El segundo baño es con acetona, sumergiéndose y retirándose inmediatamente.
    - iii. 2 Baños en agua destilada iguales que el anterior.
  - d. Dejar secar al menos por 24hs antes de usar.

#### 9.4 PROTOCOLO COLORACION: HEMATOXILINA- EOSINA

##### **Batería de hematoxilina-eosina:**

Xilol (desparafinar y montar), OH 70, 95, y 100 (desparafinar y montar), colorantes (hematoxilina y eosina).

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

##### **Consideraciones:**

Para esta técnica se trabaja con 4 embudos, 2 grandes y dos pequeños. Los 2 primeros son verde y rojo exclusivos para alcohol y xilol respectivamente. Los 2 últimos

son destinados únicamente para los colorantes, hay uno azul correspondiente a hematoxilina y otro rojo, correspondiente a eosina.

El secado de las láminas se evita cambiando los líquidos lo más rápidamente posible y el arrastre de éstos entre pasajes, sacudiendo 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 minutos (Desparafinado)
- 2- OH 100° ..... 1 minuto
- 3- OH 95° ..... 1 minuto
- 4- OH 70° ..... 1 minuto
- 5- H2O ..... 30 segundos (tiempo mínimo).
- 6- Hematoxilina ..... 20 segundos
- 7- Virado en agua ..... mínimo el mismo tiempo de hematoxilina
- 8- Eosina ..... 15 segundos
- 9- Lavado en agua (solo enjuagar)
- 10- OH 70 ..... 1 minuto
- 11- OH 95 ..... 1 minuto
- 12- OH 100 ..... 1 minuto
- 13- Xilol ..... 10 minutos (Fijación)

} Hidratación

} Tinción

} Deshidratación

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 y se coloca a 45° el cubreobjetos dejándolo caer. Una vez sobre el cubreobjetos

deben retirarse todas las burbujas de aire haciendo presión sobre el cubre 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.

Entre pasajes de alcoholes con un trapo sacudir el exceso de éstos.

Al volcar el xilol de montar en el copling 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.