



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRICOLAS

MAESTRIA EN PRODUCCIÓN ANIMAL
TESIS

EFFECTO DEL DESTETE EN LA EXPRESION DE FACTORES DE
CRECIMIENTO EN LECHONES.

PROFESOR:

DRA. ADRIANA MORALES TREJO

ALUMNO:

ING. DAVID CERVANTES GARCÍA

MEXICALI B.C. EJ. NVO LEON.

|

ÍNDICE

ÍNDICE	2
MARCO TEORICO.....	4
1. CRECIMIENTO.....	4
1.1 Concepto	4
1.2 Clasificación	4
2. REGULACIÓN HORMONAL DEL CRECIMIENTO.	5
2.1 Sistema Endocrino	5
2.2 Hormonas.....	5
2.2.1 Proteínas Ligadoras	6
2.2.2 Receptores	6
2.3 Mecanismo de acción de la GH	7
2.3.1 Hormona del crecimiento (GH)	7
2.3.2 Hormona de liberación de la hormona del crecimiento (GHRH)	8
2.3.3 IGF e IGFBP	8
2.3.4 Relación dentro del sistema de hormones GHRH, GH, IGF	9
2.4 ETAPA FISIOLÓGICA	10
2.4.1 Pre-natal	10
2.4.2 Post-natal	11
3. DESTETE.....	11
3.1 Estrés	11
3.2 Factores que afectan el destete.....	12
3.2.1 Tiempo al destete.....	12
3.2.2 Estado nutricional	13
3.2.2.1 Cambios en intestino	13
3.2.3 Relación nutrición, GH eje somatotropico	13
3.2.4 Respuesta a la administración exógena de GH con respecto a la edad del animal	15
4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	15

4.1 ADN polimerasa.....	16
4.2 Amplificación aritmética y/o geométrica	18
4.3 Evaluación del producto	18
4.4 Consideraciones	18
4.5 PCR-en tiempo real	19
4.5.1 Fundamento.....	19
4.5.2 Fluorocromo.....	19
JUSTIFICACIÓN	21
HIPOTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
EXTRACCIÓN DE RNA.....	25
RETROTRANSCRIPCIÓN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).....	25
PCR CUANTITATIVO.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFIA.....	32

MARCO TEORICO

1. CRECIMIENTO

1.1 Concepto

Menciona Gurtler (1980), que el crecimiento es un proceso biológico que no solo consiste en el aumento de tamaño, sino también en procesos de morfogénesis, diferenciación y adquisición de capacidad funcional que hacen que el aumento de tamaño se realice de una forma armónica de acuerdo con un plan preestablecido y que permite que una célula inicial, el óvulo fecundado o cigoto se transforme sucesivamente en blástula, embrión, feto, recién nacido, lactante, joven y animal maduro o adulto con una plena capacidad funcional.

1.2 Clasificación

Existen dos tipos de crecimiento, el crecimiento por **hipertrofia** resultado del aumento en el tamaño de las células, y el crecimiento por **hiperplasia** que resulta al incrementarse el número de células de un órgano o tejido. La actividad hormonal sobre tejido muscular es de tipo anabólico, mientras que en tejido adiposo es de tipo catabólico, por lo que permite que los sustratos se reordenen, aumentando la eficacia proteica dependiente de diversos factores externos (Mclaren, 1990).

En un mismo animal puede ocurrir crecimiento por hipertrofia e hiperplasia en forma combinada, sin embargo, las hormonas son quien se encargan de llevar mensajes químicos de una glándula a otra, regulando así el metabolismo, algunas de estas hormonas son la insulina y la hormona del crecimiento (Balbas, 2002).

2. REGULACIÓN HORMONAL DEL CRECIMIENTO.

2.1 Sistema Endocrino

El sistema endocrino está constituido por las glándulas de secreción interna o glándulas endocrinas, incluidas en este sistema la glándula hipófisis (pituitaria), tiroides, paratiroides, páncreas, corteza adrena, y gónadas, entre otras. El concepto clásico menciona que las glándulas endocrinas se constituyen por células en contacto con una red de vasos sanguíneos, sin embargo esta descripción anatómica se ha modificado y ahora se considera como célula endocrina a toda aquella que secreta una hormona, como son el hipotálamo, conformado por neuronas y que sintetizan y secretan hormonas liberadoras GnRH (hormona liberadora de gonadotropina), TRH (hormona liberadora de tirotropina), CRH (hormona liberadora de corticotropina), hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), hormonas inhibitoras (Somatostatina, Dopamina); el corazón que sintetiza y secreta la hormona atrial natriurética; el pulmón que secreta serotonina y endorfina; el riñón que produce eritropoyetina, y renina; el hígado que sintetiza el factor de crecimiento similar a insulina (IGF) y eritropoyetina; el tejido adiposo que produce leptina y también secreta estrona. (González, 1997).

2.2 Hormonas

La actividad del sistema endocrino es ejecutada por las hormonas. En 1902, Bayliss y Starling definieron por primera vez el concepto de hormona, como cualquier sustancia producida normalmente en las células de una región del organismo y que es llevada por el torrente sanguíneo a otras partes, sobre las cuales actúa con efecto favorable para el organismo. Actualmente se definen a las hormonas como compuestos químicos secretados en mínimas concentraciones al torrente sanguíneo por células específicas, que actúan en células distantes al lugar de origen, donde se unen a receptores específicos produciendo una respuesta biológica. (González, 1997).

2.2.1 Proteínas Ligadoras

Generalmente las hormonas ya sean de naturaleza proteica o lipídica circulan en la sangre ligadas a una proteína de unión o proteína ligadora que facilita su transporte hacia su tejido blanco en donde se unen a un receptor situado en la membrana celular en donde en algunos casos al unirse a su receptor activan al AMPc y a la proteína kinasa A y iniciando la señalización de su acción hormonal. (Fortunati 1998). La hormona de crecimiento es otro ejemplo de una hormona proteica que se une a su proteínas ligadora específica para circular en sangre hasta su receptor igualmente específico de tipo extracelular como paso necesario para su acción hormonal, cuya ausencia resulta en inactividad de la acción de la hormona del crecimiento (Rosenfeld, 1994).

2.2.2 Receptores

Muchas células son expuestas a las hormonas, sin embargo, sólo algunas responden a estas por lo que se menciona que son específicas, tal especificidad de la acción hormonal reside en la presencia de receptores en el órgano blanco que pueden reconocer su señal. Los receptores son proteínas cuyo número y afinidad puede modificarse de acuerdo a las circunstancias. Estos pueden ser de membrana, citoplasmáticos y nucleares. Por lo general tienen receptores de membrana aquellas hormonas que por su tamaño no pueden entrar a la célula o aquellas que por su poca liposolubilidad tampoco lo pueden hacer, como es el caso de las hormonas peptídicas que se une a receptores de membrana (Shiina 1997).

Las hormonas que actúan a través de receptores de membrana activan la formación de un segundo mensajero, que lleva el mensaje de la hormona al interior de la célula para la elaboración de la respuesta biológica o acción hormonal. En este tipo de receptores se unen el factor de crecimiento similar a insulina (IGF); por lo anterior se deduce que la hormona es el primer mensajero, aunque en este caso es necesario que la hormona se una previamente a una proteína ligadora que se considera como receptor extracelular que circula en sangre y sólo después de esta unión se puede unir y activar al receptor de membrana (Fortunati, 1998).

2.3 Mecanismo de acción de la GH

2.3.1 Hormona del crecimiento (GH)

La hormona del crecimiento (GH), se denomina así por el hecho de que su déficit provoca un marcado retraso en el crecimiento, es un polipéptido producido por células hipofisarias especializadas (somatotropas), localizadas en el lóbulo anterior o adenohipofisis. Dependiendo de la especie, la hormona de crecimiento es una proteína formada por un número variable de aminoácidos, aproximadamente 100 en porcinos.

La secreción de GH se encuentra bajo el control de múltiples factores hormonales y metabólicos, de forma que la acción conjunta de todos ellos determina la secreción hipofisaria de GH en un momento determinado. Sin embargo el peso que cada uno de estos factores tiene es diferente y podemos decir que existen dos factores hipotalámicos que son determinantes de dicha secreción, la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) como factor estimulante y la somatostatina como factor inhibidor. Estos dos péptidos son secretados por el hipotálamo y su combinación determina de forma decisiva la secreción de GH, aunque la acción de cada una depende, a su vez, de diversos factores como el hormonal y metabólico., además de su forma de secreción, ya que durante los picos de secreción de GHRH los niveles de

somatostatina son bajos, y cuando la secreción de GHRH cae aparecen picos de somatostatina (Plotsky, 1985).

Como todas las hormonas adenohipofisiarias la GH tiene periodos de secreción más rápidos denominados pulsos, intercalados con periodos lentos o interpulsos. El patrón de secreción de la GH es bastante característico en las distintas especies y puede variar en las distintas situaciones. En mamíferos existe un dimorfismo sexual muy marcado en la secreción pulsátil de GH, en machos aparecen pulsos de elevada amplitud y baja frecuencia, con concentraciones interpulsos indetectables; sin embargo en las hembras hay pulsos mas frecuentes con amplitudes menores y valores de GH interpulsos relativamente altos. Además, parece existir una relación entre la aparición de los pulsos con respecto al determinado momento del día que se ve influido por las horas luz y oscuridad (Jansson, 1985).

2.3.2 Hormona de liberación de la hormona del crecimiento (GHRH)

Se conoce que la GHRH es el estimulador fisiológico de la secreción hipofisiaria de la GH, fue aislado y secuenciado en 1982 (Guillemin et al y Rivier et al) a partir de tumores pancreáticos que provocaban acromegalia, estos por la capacidad de producir grandes cantidades de esta hormona.

2.3.3 IGF e IGFBP

La acción de la GH es mediada por un segundo agente liberado hacia la sangre. La GH provoca la síntesis y liberación de los factores de crecimiento similares a insulina (IGFs), particularmente el IGF-I sintetizado en el hígado y algunos otros tejidos como el muscular, convirtiéndolos en una glándula endocrina. A su vez estos tejidos sintetizan a las llamadas proteínas de unión o transportadoras del IGF (IGFBPs), estas proteínas pueden prolongar o inhibir las acciones de los IGFs (Florini, 1996).

Existen seis diferentes proteínas: IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, y IGFBP-6 que tienen la función de no sólo ser proteínas de transporte para las IGFs en la circulación hacia tejidos específicos, al protegerlas de la degradación, sino también como moduladores de la acción de la IGF (Florini,1996).

Se conocen al menos dos tipos de IGFs, en ratones knockout se ha encontrado que el segundo IGF-II es esencial para el crecimiento embrionario normal, mientras que el IGF-I tiene funciones continuas durante el desarrollo y la edad adulta (Harrel, et al 1999).

2.3.4 Relación dentro del sistema de hormonas GHRH, GH, IGF

En el organismo el crecimiento es regulado por diversos factores hormonales, los más importantes de ellos se encuentra alineados en lo que se conoce como el eje hipotálamo-hipófisis-tejidos blancos (figura 1). La regulación del crecimiento por este eje se explica de la siguiente manera: en hipotálamo se secreta la hormona de liberación de la hormona de crecimiento (GHRH), ésta viaja en sangre hacia la hipófisis que secreta la hormona del crecimiento (GH), misma que vía sanguínea llega a su receptor en hígado e induce la síntesis y liberación del factor de crecimiento similar a insulina-I (IGF-I). Este IGF unido a su proteína ligadora (IGFBP) viaja por sangre hasta sus tejidos blancos donde se encuentran los receptores (IGFR), iniciando su efecto anabólico en el organismo. Finalmente, concentraciones elevadas del IGF-I en sangre por retroalimentación negativa inhiben la secreción de GH.

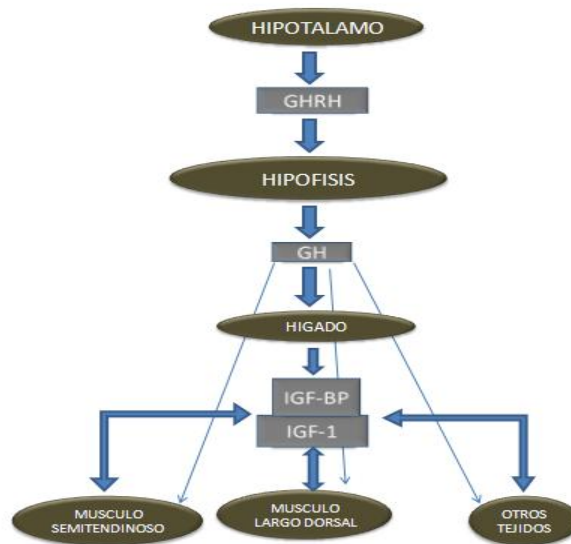


Figura 1. Esquema de las relaciones hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-tejidos blancos. Las flechas indican los efectos estimulatorios, mientras las flechas dobles indican las inhibiciones, adaptado de Florini, 1996.

2.4 ETAPA FISIOLÓGICA

2.4.1 Pre-natal

Le Roith *et al.* (2001) mencionaron que a diferencia de la función promotora del crecimiento postnatal que es bien conocida, se considera que el crecimiento fetal tiene baja dependencia respecto a la hormona del crecimiento (GH), esto como una consecuencia de la expresión tardía y la maduración paulatina de sus receptores, que asemejaba existir una resistencia hacia la hormona durante esta temprana etapa fisiológica. Sin embargo los datos que se han obtenido en estudios fenotípicos de los receptores de GH y prolactina en ratones knockout, han permitido que en la actualidad se acepte la teoría que la hormona podría actuar desde las etapas prenatales, esto es desde el periodo de

preimplantación del huevo fertilizado, en las últimas fases de crecimiento del feto y durante su transición a la vida extrauterina (Waters, 2002).

2.4.2 Post-natal

Como se ha comentado anteriormente, la hormona del crecimiento (GH) y el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-I) regulan el metabolismo y controlan la redistribución de los nutrientes absorbidos durante la etapa de crecimiento de los animales (Okada, 2001). En este sentido se ha observado que en cerdos jóvenes la administración de GH a dosis altas incrementa la velocidad de crecimiento, la eficacia alimenticia y la acumulación de tejido muscular magro, reduciendo la acumulación de tejido graso (Etherton, 2002).

3. DESTETE

3.1 Estrés

El destete al igual que el nacimiento es un momento que implica diversos cambios importantes como el cambio de dieta, separación de la madre e interacción con otros animales que establecerán un orden jerárquico. Además, el organismo sano tiende a restablecer un equilibrio fisiológico interno (homeostasis); cuando dicho organismo es agredido por estímulos externos, éste tiende a reaccionar para restablecer el equilibrio. A este proceso se le denomina respuesta de estrés (Day, 2002).

Hans definió en el siglo pasado el estrés como la respuesta fisiológica, psicológica y de comportamiento de un ser vivo hacia diferentes agentes nocivos de naturaleza física o química, denominados también factores estresantes. Dependiendo de la capacidad que tenga el lechón para su adaptación a estos cambios, el estrés afectará de forma diversa su bienestar en las distintas etapas fisiológicas y se reflejará en sus parámetros productivos (Day, 2002).

3.2 Factores que afectan el destete

Las situaciones estresantes experimentadas por el lechón al momento del destete, pueden estar asociados a diversos factores: a) factores nutricionales debido al cambio de alimento; de leche materna a alimento sólido; b) factores, físicos: debido al cambio de ambiente y temperatura los cuales deben de estar en un rango entre 22 - 28°C, con una buena ventilación y una densidad adecuada de 0.15 a 0.2 m²/ animal; c) factores psicológicos: debidos a la separación de la madre y formación de nuevos grupos en los que mediante interacciones agresivas, se establece una nueva relación jerárquica que determina el orden de acceso a los recursos dentro de un grupo social(Day, 2002).

La combinación de los cambios antes mencionados provoca una reducción marcada en el consumo de alimento, perdida de peso o bajo crecimiento, trastornos gastrointestinales, e incluso la muerte. Estos factores no solo afectan el bienestar del lechón sino también los parámetros productivos. Pajor *et al.* (1991), mencionaron que el estrés debido al destete puede durar hasta catorce días y representa de un 25 a 40 % de reducción de la tasa de crecimiento comparado con lechones que permanecieron con su madre. Aunque, algunos estudios han demostrado que un peso elevado al nacimiento y a la semana después del destete reducen considerablemente el número de días necesarios para que los cerdos consigan el peso requerido para el sacrificio (Quiniou *et al.*, 2002).

3.2.1 Tiempo al destete

En condiciones naturales los lechones se destetarían de forma gradual a lo largo de once semanas (Newberry, 1988). En explotaciones comerciales, de manera cotidiana, el destete de los lechones se realiza entre los 21 y 28 d de edad, lo cual contrasta con el destete natural. Los lechones destetados de manera precoz no han desarrollado cabalmente su sistema digestivo, además

de que su sistema inmunológico está fortaleciendo su desarrollo. Estos aspectos explican la tasa de mortalidad elevada que se observa durante el destete, resultando en índices productivos bajos.

3.2.2 Estado nutricional

Durante la etapa de destete se observa una disminución en el consumo de nutrientes, debido principalmente al cambio de dieta líquida a sólida. Esta disminución en el consumo generalmente tiene un efecto negativo en el estado nutricional de los lechonos, y su gravedad dependerá de la capacidad individual para adaptarse al cambio. (Thissen, et al ,1994).

3.2.2.1 Cambios en intestino

El intestino delgado del lechón experimenta cambios morfológicos y fisiológicos importantes durante las primeras 24 horas posterior al destete. Los principales cambios observados son atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las criptas intestinales, disminución en la actividad específica de algunas enzimas como la lactasa, y reducción de la capacidad de absorción de nutrientes (Pluske et al, 1997). Durante esta fase es común observar brotes de diarrea asociados con la proliferación de bacterias enterotoxigénicas en el intestino delgado y/o la fermentación de los nutrientes menos digestibles de la dieta en el intestino grueso (Mc Cracken y Kelly, 1993).

3.2.3 Relación nutrición, GH eje somatotropico

El estado nutritivo es uno de los factores principales en la regulación del eje somatotropico (GH - IGF-I), puesto que tanto el exceso como la deficiencia de nutrientes influyen de forma diferencial. Dentro de las primeras etapas de la vida el eje somatotropico parece ser muy sensible a las modificaciones en la alimentación, ya que dependiendo del nivel nutritivo de la dieta se facilita una maduración mas rápida de este eje respecto a animales con deficiencia en su nutrición.

Durante el destete hay una transición de un estado de resistencia tisular a la insulina, que provoca la disminución de la lipogénesis y el aumento de la glucólisis; es decir, la transición de un momento en el que se ingiere una dieta láctea, rica en grasa y baja en carbohidratos, a un estado de mayor sensibilidad a la insulina, con una dieta de textura sólida, baja en grasa y rica en carbohidratos, que facilita la adaptación a la nueva dieta,. Aunque el nivel de nutrición requerido para desencadenar un efecto óptimo del eje somatotrópico no se ha definido, se conoce que la GH favorece un incremento de la eficiencia de utilización de la proteína de la dieta, por lo que se debe mencionar el estado nutritivo como factor que afecta directamente la liberación y funcionamiento de la GH (Weller *et al.*, 1994). Además se observa un incremento en la síntesis y almacenamiento de proteína corporal de hasta 90% cuando la concentración de proteína en la dieta se incrementa de un 10% a un 18% (Campbell *et al.*; 1990).

Harel *et al.*, (1993), mencionaron que en animales sometidos a una mala nutrición proteica, se observa una disminución de la liberación espontánea del contenido hipofisario y de la concentración plasmática de GH, aunque se mantiene constante el nivel del receptor de la hormona en hígado. Además, en músculo esquelético de cerdos mal nutridos se ha demostrado tanto un aumento como una disminución de la afinidad de GH por su receptor, mientras que se incrementa su nivel de expresión con respecto a animales alimentados con una dieta normal (Dauncey, *et al.*, 1994).

Aunque la ingesta de alimento es un potente regulador de la expresión génica y de la concentración plasmática de las proteínas ligadoras IGFBPs, el incremento de estas es diferente dependiendo de la proteína de que se trate. Por ejemplo, la proteína IGFBP-3 es relativamente estable y solo disminuye después de un periodo prolongado de restricción de alimento, mientras que la IGFBP-2 se modifica rápidamente por la ingesta de alimento (Ketelslegers *et al.*, 1996).

3.2.4 Respuesta a la administración exógena de GH con respecto a la edad del animal

De acuerdo con Le Roith (1999), se han observado dos etapas de crecimiento postnatal en ratones; la primera durante el destete entre la segunda y tercer semana de vida, que no puede ser estimulada por la GH, y una segunda etapa cuando ya se realizó el destete, que comprende a partir de la tercer semana de vida hasta llegar a un crecimiento total a los 56 días de edad. Por su parte, Dunshea, et al, (1999) menciona que el efecto de la administración de GH durante el destete en cerdos parece ser evidente solo a partir de los 31 días de edad, ya que su acción parece ser nula o mínima en semanas previas. La administración exógena de GH incrementa los niveles de GHR en hígado como lo demuestran diversos estudios (Baxter, 1984).

4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida por sus siglas en inglés como PCR (Polymerase Chain Reaction), es una técnica utilizada en biología molecular, cuyo objetivo se fundamenta en la propiedad natural de la enzima polimerasa para replicar hebras de ADN. Esta técnica utiliza dos oligonucleótidos, también llamados cebadores o primers, de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, sintetizados por métodos químicos y cuyas bases son complementarias de los extremos iniciales y finales del fragmento de ADN que se va a copiar. Se utiliza un oligonucleótido diferente para cada uno de los dos extremos del fragmento de ADN, debido a que las hebras de ADN son copiadas en direcciones opuestas ya que la replicación siempre se realiza en un sentido 5' – 3' en cada una de las hebras de ADN. La copia de un fragmento de ADN se realiza en un período de aproximadamente uno a dos minutos, y ésta se repite por lo menos 30 ciclos. Cada ciclo consta de tres fases que se realizan a distinta temperatura: desnaturalización del ADN, alineación de los oligonucleótidos y por último la extensión y síntesis del fragmento de interés. En el primer ciclo se ha obtenido una copia del fragmento de ADN, en los ciclos

siguientes cada una de las copias del fragmento de ADN es copiada de nuevo, por esto se dice que la amplificación se realiza de forma exponencial (Paniagua, 2007).

Desnaturalización del ADN.

Separación total de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar. Para hacerlo se calienta el ADN a 94 °C. Ambas cadenas obtenidas servirán de "base" a las reacciones que le siguen.

Alineación de oligonucleótidos: (annealing).

La temperatura es disminuida para alcanzar la temperatura de alineación, que permite que cada oligonucleótido se fije a una sola cadena de ADN en el extremo 3' o 5'. En este momento interviene la enzima ADN polimerasa que alarga la extremidad de los oligonucleótidos utilizando desoxinucleótidos tri fosfatados (dNTPs).

Extensión de oligonucleótidos.

El último paso consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa. Formando dos cadenas complementarias dando lugar a dobles cadenas de ADN. Este proceso se repite varias veces, por lo que la reacción en cadena, permite obtener cantidades importantes del ADN original.

Tanto la alineación de los oligonucleótidos como la síntesis de ADN se efectúan a temperaturas elevadas para evitar la formación de secuencias que no son complementarias.

4.1 ADN polimerasa

Para efectuar una PCR, se deben utilizar ADN polimerasas termo-estables. La Taq DNA polimerasa, fue aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*

que habita en medios acuáticos calientes de temperaturas de alrededor de 70°C. Esta polimerasa funciona de manera óptima a 72°C. La vida media de ésta enzima calentada a 96°C es de 40 minutos. La polimerasa Taq puede ser añadida al comienzo de la reacción y funciona hasta el fin de la reacción de amplificación sin problemas.

La Taq DNA polimerasa posee una actividad 5'→3' polimerasa y 5'→3' exonucleasa, pero no tiene actividad exonucleasa 3'→5'. También posee una actividad terminal transferasa que ajusta un sólo nucleótido, con frecuencia una A, a las dos extremidades 3'-OH del fragmento amplificado. Esta habilidad es a menudo utilizada en los métodos de clonación. Dos formas de Taq polimerasa son disponibles: enzima nativa purificada de *Thermus aquaticus* y una enzima genéticamente producida en *E. coli*. Como la Taq I ADN polimerasa no tiene actividad exonucleasa 3'→5', no es capaz de eliminar los nucleótidos que no están correctamente insertados en la cadena que se forma (Saiki, 1988)

Sin embargo es capaz de incorporar un nucleótido no apareado con una frecuencia de 2/10.000 nucleótidos por ciclo. La tasa de error observado después de 30 ciclos de amplificación es del orden de 0,25 %. Esto no constituye un verdadero problema cuando se efectúa un análisis global del producto PCR. De otra manera, la incorporación equivocada de nucleótidos sí es importante, especialmente si los fragmentos van a ser utilizados para clonación. Es más peligroso si la incorporación errónea se produce al comienzo de la amplificación.

Este problema se puede resolver parcialmente utilizando una mayor cantidad de ADN molde, al comienzo de la PCR, ya que es posible también reducir el número de ciclos de amplificación y de la misma manera reducir el número de etapas de la síntesis del ADN.

4.2 Amplificación aritmética y/o geométrica

Los ciclos sucesivos producen segmentos de secuencias largas y cortas. El número de los oligonucleótidos es copiado de manera aritmética (1,2,3,4), mientras que los segmentos cortos son copiados de manera geométrica (1, 2, 4, 8, 16, 32...). El producto de la reacción geométrica es un fragmento de ADN donde las extremidades están marcadas por el final 5' de los oligonucleótidos utilizados como moldes y por tanto la longitud del fragmento es corta.

4.3 Evaluación del producto

Producto de PCR se evalúa mediante un gel de agarosa en electroforesis, coloreado con bromuro de etidio. Generalmente el tamaño de los fragmentos se sitúa alrededor de 0,2 a 2 kb, pero pueden llegar a 15 kb. Si la secuencia a amplificar se conoce, se puede verificar que el tamaño del producto PCR total corresponda al tamaño calculado esto con un marcador de peso molecular. Se puede también verificar, mediante la digestión del producto PCR y con enzimas de restricción. (Saiki, 1988).

4.4 Consideraciones

El PCR es capaz de amplificar no sólo una sola molécula de ADN, se debe prestar mucha atención a la contaminación, pues residuos de ADN extraños podrían ser por error copiadas.

Minúsculos volúmenes como gotas de aerosol provenientes de una micro pipeta pueden contener un número importante de fragmentos listos a ser copiados.

Lo ideal sería de tener un juego de pipetas sólo reservados para PCR, usar guantes, y guardar bien los reactivos.

4.5 PCR-en tiempo real

A diferencia de la técnica de PCR convencional, que mide la acumulación de ADN al final de un número predeterminado de ciclos, con PCR de tiempo real, la lectura de la cantidad de DNA amplificado se hace en cada ciclo de amplificación usando un fluoróforo, de esta manera un incremento en la fluorescencia de la reacción indica un aumento proporcional a la cantidad de ADN formado.

4.5.1 Fundamento

El PCR en tiempo real combina un termociclador, un espectrofotómetro y una computadora. El termociclador efectúa la PCR en muestras que contienen el fluorocromo, proporcional a la cantidad de DNA, cantidad que dobla de ciclo en ciclo. Un rayo láser excitador es transmitido a la muestra por una fibra óptica. La emisión fluorescente inducida es enviada al espectrofotómetro que la analiza a diferentes longitudes de onda.

A menudo, la misma fibra transmite el rayo excitador y recibe la fluorescencia. En el monitor de la computadora se indican, después de cada ciclo, las fluorescencias leídas dentro de la longitud de onda elegida para la muestra. (Hockett, 1999).

4.5.2 Fluorocromo

El primer fluorocromo utilizado fue el bromuro de etidio, este se intercala entre las bases, la fluorescencia que el confiere al ADN es proporcional a la cantidad de ADN presente. Otro fluoróforo empleado es el SYBR Green, que al igual que el bromuro de etidio, se une preferentemente al ADN de doble cadena, y al hacerlo incrementa fuertemente su fluorescencia, al unirse al ADN de doble cadena recién sintetizado en cada ciclo, éste reactivo emite una fluorescencia proporcional a la concentración de DNA. La señal puede medirse una vez por ciclo o bien continuamente, y aparece en la pantalla de la computadora. La señal aparecerá claramente a partir de un número determinado de ciclos, dependiendo

de la concentración de inicio, y esta sola se lee por el espectrofotómetro cuando ella sobrepasa el valor de detección límite del aparato, o sea cuando ella sobrepasa el ruido de fondo. (Herveg y Barcia-Macay, 2004)

JUSTIFICACIÓN

Debido a que no se tienen identificados y bien definidos los patrones de expresión y liberación de los factores de crecimiento durante el destete de los animales se tiene un amplio campo de desarrollo en la generación de conocimientos relacionados con su funcionamiento y desempeño en etapas posteriores de su producción.

HIPOTESIS

La expresión de la hormona de crecimiento (GH), del factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-I), su transportador (IGFBP) y receptor de IGF (IGFR) en lechones se afecta por el estrés que experimenta durante el periodo de destete.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer el efecto del destete en el patrón de expresión de GH, IGF, IGFB, IGFR en lechones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la expresión de RNA mensajeros para los factores de crecimiento GH, IGF, IGBP e IGFR antes y dos días posteriores al destete

Determinar si existe variación en la expresión de los factores de crecimiento antes y dos días después del destete.

METODOLOGÍA

El experimento se realizó con 20 lechones machos de diferentes camadas y de raza Landrace X Yorkshire X Duroc. El manejo de cada uno de los lechones que participaron en el experimento consistió en lo siguiente: al quinto día de nacidos se realizó la aplicación de hierro, descolmillado, descole, castración y tatuaje; al noveno día se repitió la administración de hierro. Los lechones seleccionados fueron alimentados por sus madres y a partir del séptimo día se ofreció un alimento preiniciador a base de trigo y pasta de soya.

Cuadro 1. Pesos al nacimiento, y al día de sacrificio del animal seleccionado.

Peso (kg)	Pre Destete		Post Destete	
	Nacimiento	Sacrificio	Nacimiento	Sacrificio
	1.4	4.0	1.4	6.7
	1.5	6.3	1.5	8.7
	1.7	8.9	1.7	8.4
	1.6	7.9	1.6	7.8
	1.5	6.9	1.6	7.3
	1.7	4.8	1.6	5.3
	1.4	8.0	1.4	9.1
	1.4	8.5	1.3	6.9
	1.7	7.3	1.7	6.4
	1.8	6.5	1.65	8.0
Total	15.7	69.1	15.4	74.6
Media	1.57	69.1	1.54	7.46

Un grupo de 10 lechones seleccionado al azar fue sacrificado el día 28 de edad, y un segundo grupo (10 lechones) fue destetado el mismo día y sacrificado a los 30 días de edad (dos días posteriores al destete). Al momento inmediato al sacrificio se realizó la toma de muestras, para evitar cualquier daño al RNA, las muestras fueron colocadas en microtubos de 2 ml, depositadas en nitrógeno líquido y posteriormente mantenidas en congelación a - 80°C hasta su procesamiento.

Las muestras colectadas fueron de los siguientes tejidos: hipófisis para medir la expresión de los mRNA de GH; músculo largo dorsal y semitendinoso

para medir la expresión de IGF, IGFR; e hígado para medir la expresión de IGF, IGFBP, IGFR.

EXTRACCIÓN DE RNA

Todas las muestras fueron procesadas para su extracción de RNA total, empleando la siguiente metodología: aproximadamente 200 mg de tejido aún congelados fueron colocados en un mortero y se les adiciono nitrógeno liquido hasta cubrir el tejido para macerarlo hasta obtener un polvo fino. El tejido fue recuperado en un microtubo y se le adicionaron 1000 µl de Trizol Reagent (Invitrogen, USA), se homogenizo y centrifugó la muestra durante 10 minutos a 10000 rpm a 4 °C. A continuación se recuperó la fase líquida y se incubó en hielo durante 5 minutos; al término se agregaron 200 µl de cloroformo frío, se agitó vigorosamente e incubó en hielo por 2 minutos para centrifugar (15 minutos a 10 000 rpm a 4 °C). Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se adicionaron 500 µl de isopropanol, la reacción se mezcló por inversión y dejó reposar en hielo durante 10 minutos para volver a centrifugar. Se decantó el sobrenadante, la pastilla de RNA que quedó adherida al tubo se lavó con 1000 µl de etanol frío al 100%, y se volvió a centrifugar la pastilla durante 5 minutos a 8500 rpm a 4 °C. Finalmente se decantó el etanol y se dejó secar la pastilla durante 10 min. a temperatura ambiente. La presencia y calidad del RNA total se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

RETROTRANSCRIPCIÓN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

En todas las muestras de RNA se realizaron ensayos de Retro Transcripción (RT) en un tubo de 500 µl se adiciono aproximadamente 200 ng de RNA, 6 µl de Buffer RT 5X, 0.75 µl DNAsa, y se aforo a 30 µl con agua DEPC, se dejo incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se incubo a 70 °C durante 5 minutos. Se adiciono 1 µl de random primer como oligonucleotido antisentido a una concentracion de 150 ng/ µl y 1 µl

de DNTP's 10 μ M se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, inmediatamente después se incubó en hielo para adicionar 2 μ l Buffer 5X, 3 μ l DTT (0.1M), 1 μ l inhibidor de RNAsa; se homogenizó e incubó a 42°C durante 2 minutos y se adicionó 1 μ l de enzima RT-superscript III (Invitrogen), se incubó a 42°C durante 50 minutos posteriormente se incubó a 70°C durante 15 minutos, al término se dejó enfriar el tubo con el cADN en hielo.

Mediante pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Sambrook y Russell, 2001) se determinó si existía la expresión de los RNA mensajeros de los factores de crecimiento de interés: GH presente en hipófisis, IGF-I en hígado y músculo, IGFBP en hígado, e IGFR en músculo largo dorsal y semitendinoso.

Los oligonucleótidos que se utilizaron para los ensayos de RT y RT-PCR se muestran en el cuadro 2. La concentración de MgCl empleado en las reacciones de PCR fue de 1.5 μ Mol y las temperaturas de amplificación empleadas fueron de 54 a 58 °C, dependiendo de la temperatura de desnaturalización (T_M) de los oligonucleótidos específicos para cada fragmento amplificado. Todas las reacciones de PCR fueron realizadas con 35 ciclos de amplificación.

Una vez terminada la amplificación, se verificó el producto de PCR mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.3 % con 5 μ l de producto de PCR.

PCR CUANTITATIVO

Para estimar si existieron diferencias en la expresión de los diferentes factores de crecimiento por efecto del destete se realizaron ensayos de PCR cuantitativo o en tiempo real. Estos ensayos permitieron cuantificar la cantidad RNA mensajeros de cada uno de los factores de crecimiento GH, IGF, IGFBP, IGFR1 presentes en los diversos tejidos y animales.

En un espectrofotómetro a 260 nm se leyó la concentración de los cDNA obtenidos mediante el procedimiento de retrotranscripción descrito

anteriormente. Con los valores de concentración obtenidos se realizaron diluciones de los cDNA para homogenizarlos a una concentración de 25 ng de cDNA/ μ l.

Para las reacciones de PCR cuantitativo se emplearon 25 ng de cDNA; oligonucleótidos específicos (sentido y antisentido) a una concentración final de 0.10 μ M de cada uno; se agregaron 10 μ l de SYBR Green Supermix (Kit iQTM SYBR[®] Green Supermix de Rad, USA), esta mezcla contiene a la enzima DNA polimerasa, un buffer con MgCl y el fluoróforo Sybr-green; la reacción fue completada a 25 μ l con agua libre de nucleasas tratada con DEPC. Las temperaturas de alineación para la amplificación de los fragmentos de los RNAm fueron de 56 a 58 °C dependiendo de la T_m de los oligonucleótidos utilizados y se realizaron con 40 ciclos de amplificación.

Para la realización de cada uno de los ensayos de PCR cuantitativo se agruparon los RNA mensajeros del mismo factor y tejido; además, en cada uno de los ensayos se amplificó un fragmento de 295 pares de bases de RNA ribosomal 18S como testigo de la calidad del cDNA. El equipo empleado para los análisis de PCR cuantitativo fue un Cromo 4 (Bio Rad) adaptado a un termociclador ADN Engine (Bio Rad) y el software utilizado para el análisis de resultados fue MJ Opticom Monitor.

Cuadro 2. Oligonucleótidos empleados para amplificar los mensajero de hormona de crecimiento (GH), factor de crecimiento similar insulina tipo I (IGF-I), receptor de IGF (IGFR), proteína de unión a IGF (IGFBP) y RNA ribosomal 18s.

RNA mensajero	Secuencia de nucleótidos	Fragmento amplificado
GH	Sentido: ATGCCCTTGTCCAGCCTATT Antisentido: CTGTTGGTGAAGACCCTGCT	286 pb
IGF-I	Sentido: CATCACATCCTCTTCGCATC Antisentido: ACATCTCCAGCCTCCTCAGA	247 pb
IGFR	Sentido: TGCAGAAGGAGCAGATGACA Antisentido: GTTTTGGCCTGGACGTAGAA	302 pb
IGFBP	Sentido: ACGTGAACCTGTTGGGAGGT Antisentido: CTGCCCATTTCAGAGACATCT	354 pb
RNA ribosomal	Sentido: TGCAGAAGGAGCAGATGACA Antisentido: GTTTTGGCCTGGACGTAGAA	295 pb

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 3 se muestran los resultados de la expresión de RNAm para la hormona de crecimiento (GH), el factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I), el receptor de IGF (IGFR), y la proteína de unión a IGF (IGFBP) en hipófisis, hígado y tejido muscular en lechones antes y después del destete.

Cuadro 3. Expresión de factores de crecimiento en lechones antes y después del destete (número de moléculas por ng de cDNA)

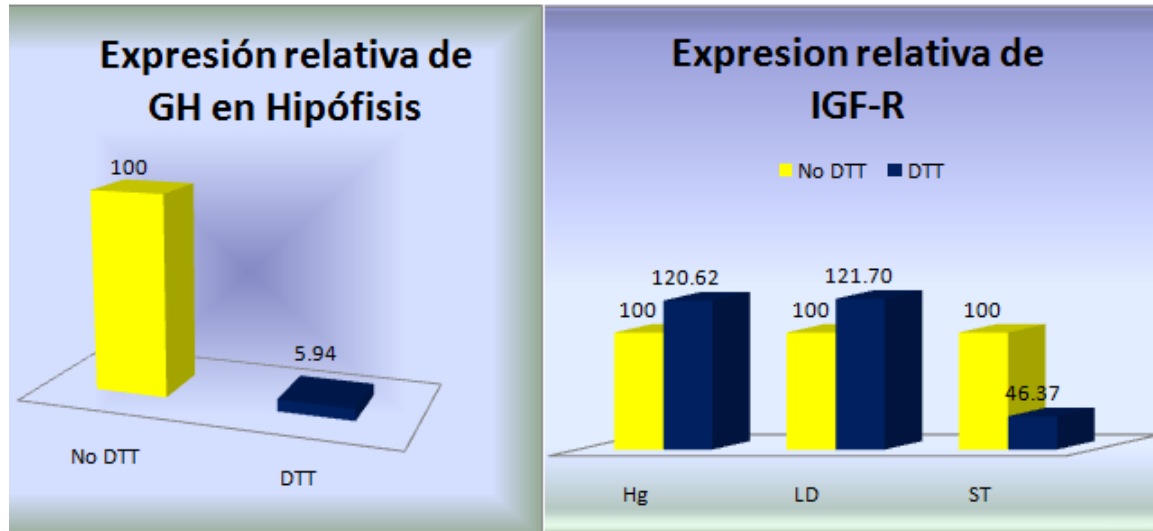
		Antes del destete		Después del destete		valor P
Tejido	RNA m	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.	
Hipofisis	GH	7.12E+04	9.41E+04	4.23E+03	2.79E+03	0.012
Hígado	IGF	4.99E+05	4.17E+05	7.00E+05	8.44E+05	0.415
	IGFR	2.28E+04	2.08E+04	2.75E+04	1.71E+04	0.514
	IGFBP	4.35E+05	1.58E+05	6.04E+06	1.85E+06	0.000
Músculo largo dorsal	IGF	5.00E+03	5.22E+03	3.73E+03	2.35E+03	0.379
	IGFR	5.48E+04	7.84E+03	6.67E+04	2.56E+04	0.085
Músculo semitendinoso	IGF	1.92E+06	9.43E+05	1.02E+06	5.95E+05	0.002
	IGFR	1.60E+05	1.12E+05	7.41E+04	3.20E+04	0.003

Cuadro 4. Expresión porcentual de hormona de crecimiento (GH), factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I), receptor de IGF (IGFR), proteína de unión a IGF (IGFBP) en lechones no destetados y destetados en los diferentes tejidos muestreados.

TEJIDO	PROTEINA	NO DESTETADO (%)	DESTETADO (%)
HIPOFISIS	GH	100	5.94E+00
	IGF	100	1.40E+02
HÍGADO	IGFR	100	1.21E+02
	IGFBP	100	1.39E+03
MLD	IGF	100	7.47E+01
	IGFR	100	1.22E+02
MST	IGF	100	5.32E+01
	IGFR	100	4.64E+01

Se observó una disminución ($p \leq 0.01$) en la expresión de la hormona del crecimiento (GH), en hipófisis por efecto del destete de los lechones; dicha disminución representa casi el 95% de la expresión que se observaba antes de destetar a los lechones (Figura 2). En la literatura disponible no se encontró información acerca del efecto del destete en la expresión de GH; sin embargo, se han observado que el estado nutritivo es un factor que afecta directamente la liberación y funcionamiento de la hormona del crecimiento (Weller et al, 1994), así mismo Harel et al (1993), observaron que existe una disminución en la liberación espontánea de la hormona del crecimiento en animales sometidos a una deficiente nutrición proteica, lo cual concuerda con el estrés provocado por el destete además de que existe un cambio drástico en la alimentación del lechón cuando esto ocurre.

Figura 2. Expresión relativa de hormona de crecimiento (GH), el receptor de IGF (IGFR), en hígado (Hg), músculo largo dorsal (LD) y semitendinoso (ST) en lechones no destetados y destetados.

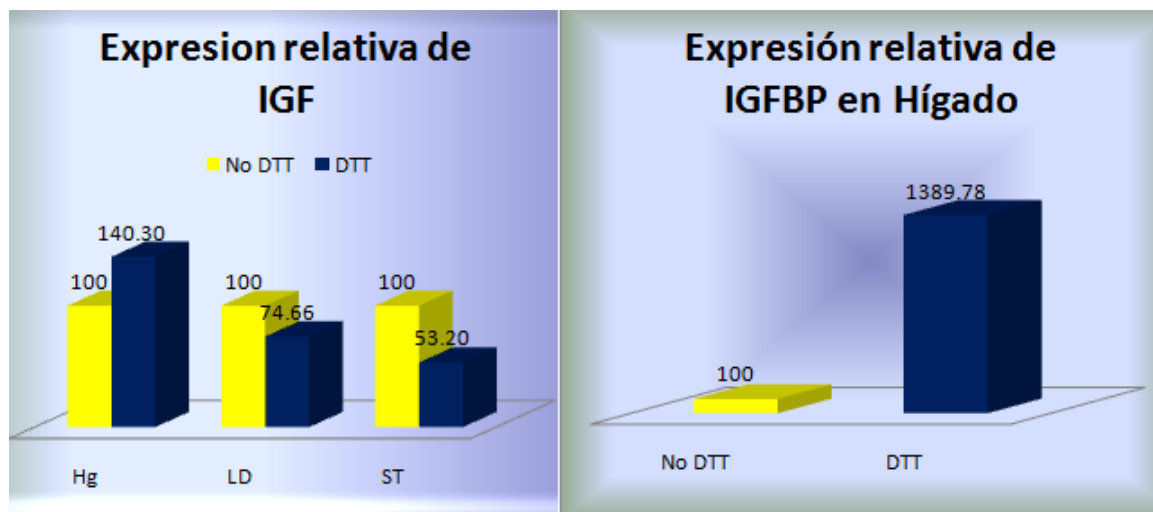


Se han observados incrementos en la expresión del receptor para GH en hígado, músculo y tejido adiposo (Matteri et al., 2000), lo cual sugiere un aparente incremento en la expresión de esta hormona.

Existió una disminución ($p \leq 0.003$) en la expresión de IGFR en músculo semitendinoso por efecto del destete de los lechones, representando 53.6% de la expresión que se observó antes de realizar el destete de los animales, los valores observados en hígado ($p \leq 0.51$) y músculo largo dorsal ($p \leq 0.08$) no mostraron ser significativos.

El destete provocó una disminución en la expresión de IGF-1 en músculo semitendinoso ($P \leq 0.002$); dicha disminución representa casi el 46.8% de la expresión que se observaba antes de destetar a los lechones, sin embargo no se afectó en músculo largo dorsal ($P \leq 0.37$), ni en hígado ($P \leq 0.41$). La expresión de IGFBP se incrementó drásticamente ($P \leq 0.03 \times 10^{-8}$) por el efecto del destete; equivalente al 1390%, (Figura 3), con respecto a lo observado antes del destete. Actualmente, en esta especie no existen reportes claros acerca de la expresión de IGF1 e IGFBP (Grant et al., 1991 y Oksbjerg et al., 2004); aunque, Matteri et al. (2000) no encontraron ningún efecto en la expresión de IGF-1 e IGF-BP en hígado y músculo.

Figura 3. Expresión relativa de la expresión de el factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I) y la proteína de unión a IGF (IGFBP) hígado (Hg), músculo largo dorsal (LD) y semitendinoso (ST) en lechones no destetados y destetados.



CONCLUSIONES

El destete provoca efectos diferentes en la expresión de los factores reguladores de crecimiento en el cerdo, dependiendo del tejido que los produce.

BIBLIOGRAFIA

Campbell, R.G.; Johnson, R.G.; Taverner, M.R.; Meisinger, D. (1990) Interaction of dietary protein content and exogenous porcine growth hormone administration on protein and lipid accretion rates in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 68: 3217-3225

Dauncey, M.J.; Burton, K.A.; White, P.; Harrison, A.P.; Gilmour, R.S.; Duchamp, C.; Cattaneo, D. (1994) Nutritional regulation of growth hormone receptor gene expression. *FASEB J.* 8: 81-88

Day, J.E.L., Spooler, H.A., Ma, Burfoot, A., Chamberlain, H.L., Edwards, S.A. (2002) The separate and interactive effects of handling and environmental enrichment on the behaviour and welfare of growing pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 75: 177- 192.

Dunshea, F.R.; King, R.H.; Owens, P.C.; Walton, P.E. (1999) Moderate doses of porcine somatotropin do not increase plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) or IGF binding protein 3. *Domest. Anim. Endocrinol.* 16 (3): 149-157

Fortunati N, Raineri M, Cignetti A, Hammond GL, Frairia R. Control of membrane sex hormone-binding globulin-receptor (SHBG-R) in MCF-7 cells: effect of locally produced SHBG. *Steroids* 1998; 63:282-284.

Gonzales GF. Fisiología Endocrina y de la Reproducción. *Rev. Per. Endocr. Metab.* 1997;3: 3-26.

González GF. Serotonina sanguínea: Regulación y significación endocrina. *Rev. Soc Per. Endocrinol* 1997;3:77-94.

Grant AL, Helferich WG, Kramer SA, Merkel RA, Bergen WG. 1991. Administration of growth hormone to pigs alters the relative amount of insulin-like growth factor 1 mRNA in liver and skeletal muscle. *J. Endocrinol.* 130:331-338.

Harel, Z. & Tannenbaum, G.S. (1993) Dietary protein restriction impairs both spontaneous and growth hormone-release in the rat. *Endocrinology*. 133: 1035-1043

Harrel, R.J.; Thomas, M.J.; Boyd, R.D.; Czerwinski, S.M.; Steele, N.C.; Baumann, D.E. (1999) Ontogenic maturation of the somatotropin insulin-like growth factor axis. *J. Anim. Sci.* 77: 2934-2941.

Hockett RD. 1999. Adaption of Existing PCR Protocols for the LightCycler System. Roche Molecular Biochemicals, No 3.

Jansson, J.O; Eden, S.; Isaksson, O.G.P. (1985) Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocr. Rev.* 6: 128-132.

Ketelslegers, J.M.; Maiter, D.; Maes, M.; Underwood, L.E.; Thissen, J.P.(1996) Nutritional regulation of growth hormone and insulin-like growth factor-binding proteins. *Horm. Res.* 45: 252-257.

LeRoith, D.; Bondy, C.; Yakar, S.; Liu, J.L.; Butler, A. (2001) The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr. Rev.* 22: 53-74.

Matteri, R. L., C. J. Dyer, K. J. Touchette, J. A. Carroll, and G. L. Allee. 2000. Effects of weaning on somatotrophic gene expression and circulating levels of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-2 in pigs. *Domest. Anim. Endocrinol.* 19:247–259.

Mc Cracken, K.J., Kelly, D. (1993) Development of digestive function and nutrition disease interaction in the weaned pig. Department of Biochemistry Microbiology and Nutrition, Univesity of England, Armidale, Australia, pp 182-192.

Mclaren, D.P.G.; Bechtel, P.J.; Grebner, G.L.; Novakofski, J.; 1990 Dose response in growth of pigs injected daily whit porcine somatotropin from 57 to 103 Kg. *J. Anim. Sci* 68: 640-647.

Newberry, R.C. & Wood-Gush, D.G.M. (1998). Development of some behaviour patterns in piglets under semi-natural conditions. *Animal Production*, 46: 103-109

Okada, S. y Kopchick, J.J. (2001) Biological effects of growth hormone and its antagonist. *Trends. Mol. Med.* 7, 5: 126-132

Oksbjerg N, Gondret F, Vestergaard M. 2004. Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system. *Domest. Anim. Endocrinol.* 27:219-240.

Pajor, E.A., Fraser, D., Kramer, D.L. (1991) Consumption of solid food by suckling pigs: individual variation and relation to weight gain. *Applied Animal Behaviour Science*, 32:139-151.

Paniagua, 2007 Biología celular, tercera edición Ricardo Paniagua

Pluske, J.R.; Hampson. D.J.; Williams, I.H. (1997). Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig. *Review livestock production science*, 51:215-236.

Quiniou, N., Dagorn, J., Gaudre, D. (2002). Variation of piglets birth weight and consequences on subsequent performance. *Livestock Production Science*, 78: 63-70.

Rosenfeld RG. Circulating growth hormone binding proteins. *Horm Res* 1994; 42:129-132.

Saiki R. K; Gelfand D. H; Stoffel S; Scharf S. J; et al. (1988) Amplificación enzimática. Cartilla dirigida de la DNA con una polimerasa termoestable de la DNA. *Science*, 239(4839):487-91

Shiina H, Igawa M. Androgen-biosynthesis, receptor and action. *Nippon Rinsho* 1997; 55:2860-2864.

Thissen, J.P.; Ketelsleger, J.M.; Underwood, L.E. (1994) Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr. Rev.* 15: 80-101

Waters, M.J. y Kaye, P.L. (2002) The role of growth hormone in fetal development. *Growth hormone & IGF Res.* 12 : 137-146

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. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 266: E776-E785.