

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA  
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos  
Departamento de Producción Agraria

TESIS DOCTORAL



*EXPRESIÓN DE MARCADORES MOLECULARES  
IMPLICADOS EN LA ADIPOGÉNESIS EN EL TEJIDO  
INTRAMUSCULAR EN VACUNO DE CARNE*

Memoria para optar al grado de Doctora del programa de Doctorado en

Biotecnología presentada por

LARA MARTÍNEZ DEL PINO

Directoras:

Beatriz Soret Lafraya

Ana Arana Navarro

Pamplona, 2017





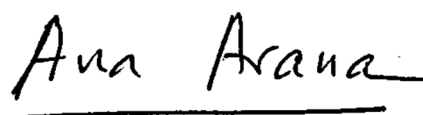
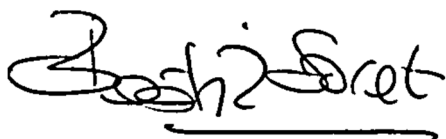
Dña. **BEATRIZ SORET LAFRAYA**, Profesora Titular del Área de Producción Animal del Departamento de Producción Agraria de la Universidad Pública de Navarra y

Dña. **ANA ARANA NAVARRO**, Catedrática de Universidad del Área de Producción Animal del Departamento de Producción Agraria de la Universidad Pública de Navarra,

CERTIFICAN que:

La presente memoria de Tesis Doctoral titulada “Expresión de marcadores moleculares implicados en la adipogénesis en el tejido intramuscular en vacuno de carne” elaborada por Dña. **LARA MARTÍNEZ DEL PINO** ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firman la presente en Pamplona a 31 de Mayo de 2017



Fdo: Beatriz Soret Lafraya

Fdo: Ana Arana Navarro



*A mis padres*

*A mis hermanas*

*A Pancho y a Lidón*

*A Koldo*



*“Lo esencial es invisible a los ojos”*

*Antoine de Saint-Exupéry*



Las investigaciones realizadas en el presente trabajo se han llevado a cabo gracias a la colaboración de la asociación ASPINA, que ha ayudado en la selección de los animales, y a las empresas "La Protectora", "Fribin" y "Vacuno de Navarra", que han facilitado la realización del muestreo.

Parte de este trabajo se incluye en el proyecto de investigación RTA2013-00046-C03-03 (INIA), gracias al cual es financiado.

Esta tesis ha sido llevada a cabo gracias a la beca predoctoral concedida a Dña. Lara Martínez del Pino por la Universidad Pública de Navarra.

Especial agradecimiento al Institute for Innovation & Sustainable Development in Food Chain (IS-FOOD) por su apoyo.





## AGRADECIMIENTOS

Los años de trabajo en la elaboración de una tesis doctoral suponen una experiencia personal, académica y profesional, en la que se dan momentos de optimismo y pesimismo, de progresos y estancamientos. Es en estos últimos dónde más he necesitado ayuda y estímulo. Ahora, en el final de esta etapa, llega el momento de mostrar mi gratitud a todas aquellas personas que, de una forma u otra, han compartido conmigo este largo camino y me han apoyado.

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento a mis directoras de Tesis **Beatriz Soret Lafraya** y **Ana Arana Navarro**, por acogerme en el grupo, corregirme, dirigirme, volverme a corregir y enseñarme tanto. Puede resultar obvio decir que sin vosotras dos esto no hubiese sido posible, pero realmente es así y deseo expresároslo. Especialmente, quiero poner de relieve el apoyo y afecto recibido por vuestra parte en los meses iniciales de la tesis, que me sirvieron para acometer este proyecto con renovado entusiasmo. Muchas gracias.

Igualmente, quiero transmitir mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han acompañado durante estos años en la universidad. A todo el grupo de Producción Animal, Calidad y Tecnología de la Carne y a los integrantes del IS-FOOD, **M<sup>a</sup> José Berriáin**, **Antonio Purroy**, **Leo Alfonso**, **José Antonio Mendizábal**, **Kizkitza Insausti**, **Vicky Sarriés**, **Gregorio Induráin**, **Marta Ruiz** y **Olaia Urrutia**. Gracias por aceptarme como una más desde el comienzo, por esos cafés y comidas llenas de anécdotas y risas que recordaré por mucho tiempo y por haberme hecho sentir como en casa. También a **Pere Albertí** y sus compañeros del CITA por su ayuda indispensable en el muestréo de los animales.

De nuevo tengo que mencionar a **Olaia Urrutia** por su inestimable ayuda, tanto en el ámbito profesional como en el personal. Gracias por compartir tanto de ti conmigo y por ser tan única como eres. También, gracias a **Marta Ruiz** por tantas y tantas risas, porque la estancia en Irlanda no hubiese sido lo mismo sin ti, por tantas charlas, confidencias y, por supuesto, catas. Este año empezamos etapas muy importantes en nuestras vidas, pero siempre estaréis en un rinconcico de mi corazón. Así mismo, gracias a todos los alumnos de máster y grado que han pasado por el laboratorio, **Miguel**

**Echeverría, Natalia Landa**, en especial, a **Irache Echeverría** por su inestimable ayuda en el laboratorio y a **María Benavent** por todas esas horas de charla durante tu paso por la universidad, también después y, sobre todo, por tu amistad. Muschísimas gracias a **Myriam Echeverría** y **Maite Añorga** por todo el compañerismo y cariño que me habéis mostrado siempre, vuestro apoyo ha sido indispensable.

Toda mi gratitud para **Isabel Maquirriain** que, con tanta paciencia y tan eficientemente, nos has solucionado cualquier duda y problema que tuviésemos en el laboratorio, por estar siempre dispuesta a ayudar en todo, así como por tu compañerismo y capacidad de escucha.

Thanks a million to **Sinead Waters** and **David Kenny** for their supervision during my stay at the Teagasc, Animal & Grassland Research and Innovation Centre in Grange, Dunsany, Co. Meath (Ireland), for the welcome reserved understanding and patience. Many thanks also to **Natasha Ferguson** and **Kate Keogh** for all your support and friendship and to the rest of the people of Teagasc, **Anne-Marie English**, **Dagmara Niedziela**, **Jason Devoy**, **Tom Hall**, **Joe Lim**, **Pearl Nolan** and of course thanks to **Himanshu Punia** to share so much experiences with me. Furthermore I would like to thank the rest of the members of the lab for the support and the pleasant atmosphere. Y, por supuesto, a ese pequeño reducto castellano-parlante formado por **Tori Miccoli** e **Irene Malo** por todas esas risas y mini excursiones, salidas al cine y a la pista de hielo con nuestros “Christmas jumper” tan geniales. Gracias por todo y por hacerme sentir algo más cerca de casa durante esos meses en Irlanda.

Mi agradecimiento a todas las personas que me han acompañado en mi vida académica y personal, porque la realización de esta tesis no es sólo el trabajo de estos últimos años de beca, sino que también es resultado de todo el esfuerzo puesto durante la carrera. Esta, no hubiese sido la misma sin vosotros los biolokos, **Xabi**, **Joxua**, **Aroa**, **Aser**, **Ana**, **Soraya**, **Cynthia**, **Laura** y, especialmente sin ti, **Julia**, gracias por acompañarme en esos años de Bilbao. No quiero olvidarme de expresar un gran agradecimiento, aunque quizás parezca remontarme demasiado atrás en el tiempo, a dos personas que creyeron en mí, ya desde el colegio, como son **Noemí Reyes**, y sobre todo, a quien puso la semilla de la pasión por la biología en mi vida, a **Lourdes Izaga**. Puede que no seáis del todo

conscientes de lo que significó vuestro apoyo para mí en esos momentos en lo que todo son dudas. Por eso, quiero pedirlos que sigáis haciéndolo tan bien como siempre.

Por supuesto, infinitas gracias a mi cuadrilla, a los Spynkinianos de ahora y siempre: **Marta, Adrián, Chantal, Nadia, María y Koldo** y, a las más recientes adquisiciones, **Cristina y Arke**. Gracias por haber compartido tantos momentos juntos desde hace tanto tiempo, por ser tan pacientes conmigo y por hacerme sentir como en casa, esté donde esté, cada vez que os veo aunque solo sea un ratito. Podéis sentirlos orgullosos de haber sido capaces de soportar ya a tres doctorandos en sus etapas finales de escritura de tesis en el grupo y eso es digno de mención y porque “*We were born to make history*”. También, gracias de corazón a **Benoît** por tu apoyo y disponibilidad incondicionales, porque has demostrado que la amistad no entiende de años ni de distancia, porque siempre has sabido cuándo escuchar, cuándo dar buenos y sabios consejos y cuándo, simplemente, hacerme reír hasta no poder más. Gracias, igualmente, a **Ari, Uli y Cristina T.** por mostrarme siempre una cara amiga y por compartir tantas cosas conmigo.

Muchísimas gracias a mi familia. En especial, a mis padres **Manolo y Nines** por todo el apoyo incondicional y desinteresado que he recibido de vosotros ahora y siempre. Y a mis hermanas, **Marta y Alicia**, porque, aunque no entendíais del todo lo que os iba contando, siempre me habéis escuchado pacientemente y habéis estado conmigo tanto en los buenos como en los malos momentos. Habéis compartido mis dudas e inquietudes, pero también las alegrías, tanto las pasadas como las que vendrán próximamente y porque, por encima de todo, siempre habéis estado y estaréis ahí, aunque sea a una horica de Pamplona, que no es tanto. También, gracias a mis “padres políticos” **Pancho y Lidón** por estar disponibles para cualquier cosa siempre y por todo el apoyo desinteresado que he recibido por vuestra parte tanto durante la realización de esta tesis como en el resto de las cosas. Que ya es la tercera tesis que tenéis en la familia y eso no lo dice cualquiera. Por supuesto, a **Irache e Iker** y a mis dos amores de sobrinos **Olárizu y Aratz** que tanta luz habéis aportado a mi vida.

Y por último, gracias a ti, **Koldo**. Gracias por darme siempre tu apoyo, gracias por aconsejarme y, sobre todo, gracias por acompañarme en todas mis decisiones desde hace

ya tanto tiempo. Gracias por todo lo que te has involucrado en esta tesis, por ser el gestor bibliográfico más fiable que he podido tener y por tu comprensión en los buenos y en los malos momentos. Esta aventura se nos termina, pero empezamos otra más importante y sé, no me cabe ninguna duda, que la vamos vivir muy bien, juntos.

## INDICE

INDICE .....	I
ÍNDICE DE TABLAS .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	XV
ABSTRACT / RESUMEN.....	1
CHAPTER 1. INTRODUCCIÓN .....	11
CHAPTER 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	19
1. Carne de vacuno.....	21
1.1. Situación del sector de vacuno de carne .....	21
1.2. Calidad de la carne.....	22
2. Razas.....	24
2.1. Pirenaica.....	25
2.2. Frisona.....	26
3. Tejidos que componen la carne .....	28
4. Tejido muscular.....	28
4.1. Miogénesis .....	31
4.1.1. Principales reguladores de la miogénesis.....	32

5. Tejido conectivo.....	36
5.1. Fibrogénesis.....	38
5.1.1. Principales reguladores de la fibrogénesis.....	39
6. Tejido adiposo .....	40
6.1. Adipogénesis.....	43
7. Desarrollo del tejido adiposo intramuscular; relación con la miogénesis y la fibrogénesis.....	52
8. Cuantificación de la expresión génica como técnica de estudio.....	55
9. Referencias .....	56
CHAPTER 3. OBJECTIVES AND EXPERIMENTAL APPROACH.....	73
1. Objectives .....	75
2. Experimental approach .....	76
CHAPTER 4. MATERIALS AND METHODS .....	79
1. Animal and rearing conditions .....	81
1.1. Ethical approval.....	81
2. Sample collection.....	82
3. Chemical traits.....	83
3.1. Chemical fat percentage.....	83
3.2. Protein percentage.....	83
3.3. Total and soluble collagen .....	84
3.4. Moisture percentage .....	84
4. Adipocyte size analysis.....	85

<b>5. RNA isolation .....</b>	<b>85</b>
5.1. Muscle samples .....	85
5.2. SAT samples .....	86
5.3. RNA concentration and quality assessment.....	87
<b>6. Gene expression study.....</b>	<b>87</b>
6.1. cDNA synthesis.....	87
6.2. qPCR.....	88
6.3. Reference genes.....	89
6.4. Primers selection and design .....	90
6.5. Primers specificity.....	92
6.6. Primers efficiency.....	94
<b>7. Statistical methods.....</b>	<b>95</b>
7.1. Chemical traits .....	95
7.2. Adipocyte size analysis .....	96
7.3. Gene Expression.....	97
7.4. Variability analysis .....	98
<b>8. References.....</b>	<b>99</b>

**CHAPTER 5: STUDY I. ADIPOSITY AND ADIPOGENIC GENE EXPRESSION  
IN FOUR DIFFERENT MUSCLES IN BEEF CATTLE..... 101**

<b>1. Introduction.....</b>	<b>103</b>
<b>2. Results .....</b>	<b>104</b>
2.1 Chemical traits .....	104
2.2 Adipocyte size analysis .....	105
2.3. Gene expression.....	108
2.4. Variability analysis .....	110

3. Discussion .....	116
4. References .....	121

**CHAPTER 6. STUDY II. EFFECTS OF THE INTERACTION BETWEEN  
MUSCLE TISSUE TYPE AND GENOTYPE ON ADIPOGENIC GENE  
EXPRESSION.....**

.....	127
1. Introduction .....	129
2. Results.....	130
2.1. <i>Animals</i> .....	130
2.2. <i>Chemical traits</i> .....	130
2.3. <i>Adipocyte size analysis</i> .....	132
2.4. <i>Gene expression</i> .....	134
2.5. <i>Variability analysis</i> .....	136
3. Discussion .....	139
4. References .....	143

**CHAPTER 7: STUDY III. RELATIONSHIP BETWEEN THE EXPRESSION OF  
GENES INVOLVED IN ADIPOGENESIS, MYOGENESIS AND  
FIBROGENESIS .....**

.....	147
1. Introduction .....	149
2. Results.....	150
2.1. <i>Chemical traits</i> .....	150
2.2. <i>Gene expression</i> .....	152
2.3. <i>Variability analysis</i> .....	155
3. Discussion .....	163



4. References.....	167
CHAPTER 8. DISCUSIÓN GENERAL.....	173
CHAPTER 9. CONCLUSIONS / CONCLUSIONES.....	195



## ÍNDICE DE TABLAS

Table 4.1. RefFinder stability study results for the reference genes analysed. ....	90
Table 4.2. Oligonucleotide sequences, amplicon size and source of the adipogenic, fibrogenic, myogenic, genes, citoquinas and reference genes selected. ....	91
Table 4.3. Slopes, R2 and Efficiency values for the adipogenic, fibrogenic, myogenic, genes, citoquinas and reference genes selected. ....	95
Table 5.1. Mean values and mean standard errors for the chemical traits measured in <i>longissimus thoracis</i> , <i>semitendinosus</i> , <i>masseter</i> , and <i>sternomandibularis</i> muscles. ....	105
Table 5.2. Descriptive parameters for adipocyte size distribution in <i>longissimus thoracis</i> and <i>semitendinosus</i> muscles. ....	107
Table 5.3. Descriptive parameters for adipocyte size distribution in <i>masseter</i> , <i>sternomandibularis</i> muscles, and subcutaneous adipose tissue. ....	107
Table 5.4. Differences in normalized expression values between muscles <i>longissimus thoracis</i> , <i>semitendinosus</i> , <i>masseter</i> and <i>sternomandibularis</i> . ....	108
Table 5.5. Differences in normalized expression values between <i>longissimus thoracis</i> , <i>semitendinosus</i> , <i>masseter</i> , <i>sternomandibularis</i> , and subcutaneous adipose tissue. ....	109
Table 5.6. Mean, minimum, maximum and coefficient of variation (CV) of Cq values and estimated standard deviations for inter-animal variation, processing steps (Sampling, RT and qPCR) and total variance in muscles <i>longissimus thoracis</i> , <i>semitendinosus</i> , <i>masseter</i> and <i>sternomandibularis</i> for adipogenic markers. ....	112
Table 5.7. Mean, minimum, maximum and coefficient of variation (CV) of Cq values, estimated standard deviations for inter-animal variation, processing steps (Sampling, RT and qPCR) and total variance in muscles <i>longissimus thoracis</i> , <i>semitendinosus</i> , <i>masseter</i> and <i>sternomandibularis</i> for reference genes. ....	113
Table 5.8. Mean, minimum, maximum and coefficient of variation (CV) of Cq values, estimated standard deviations for inter-animal variation, processing steps (Sampling, RT and qPCR) and total variance in subcutaneous adipose tissue. .	114

Table 6.1. Mean values, mean standard errors and P-value for the comparison of descriptive parameters considered for the chemical traits measured in <i>longissimus thoracis</i> and <i>masseter muscles</i> for Pirenaica and Friesian bulls.....	131
Table 6.2. Mean values, mean standard errors and P-value for the comparison of descriptive parameters considered for the chemical traits measured in Pirenaica and Friesian bulls for <i>longissimus thoracis</i> and <i>masseter muscles</i> . ....	131
Table 6.3. Descriptive parameters for adipocyte size distribution in <i>longissimus thoracis</i> muscle in Pirenaica and Friesian bulls, mean standard errors and P-value.....	133
Table 6.4. Descriptive parameters for adipocyte size distribution in <i>masseter</i> muscle in Pirenaica and Friesian bulls, mean standard errors and P-value.....	134
Table 6.5. Differences in normalised expression values in <i>longissimus thoracis</i> and <i>masseter</i> for Pirenaica and Friesian bulls. ....	135
Table 6.6. Differences in normalised -expression values in <i>longissimus thoracis</i> and <i>masseter</i> muscles for Pirenaica and Friesian bulls. ....	135
Table 6.7. Mean, Minimum, maximum, and CV of the Cq values, estimated standard deviations for inter-animal variation, processing steps (Sampling, RT and qPCR) and total variance in <i>longissimus thoracis</i> (A) and <i>masseter</i> (B) muscle for adipogenic markers in Pirenaica and Friesian bulls. ....	137
Table 7.1. Mean values, standard errors and P-value for the comparison of <i>longissimus thoracis</i> and <i>masseter</i> muscles in Pirenaica and Friesian bulls of descriptive parameters considered for the chemical traits measured. ....	151
Table 7.2. Mean values, standard errors and P-value for the comparison of <i>longissimus thoracis</i> and <i>masseter</i> muscles between Pirenaica and Friesian bulls of descriptive parameters considered for the chemical traits measured. ....	152
Table 7.3. Differences in normalised -expression values in <i>longissimus thoracis</i> and <i>masseter</i> muscles for Pirenaica and Friesian bulls. ....	153
Table 7.4. Differences in normalized expression values in <i>longissimus thoracis</i> for Pirenaica and Friesian bulls. ....	154

Table 7.5. Mean, Minimum, maximum, and CV of the Cq values, estimated standard deviations for inter-animal variation, processing steps (Sampling, RT and qPCR) and total variance for fibrogenic genes *FNI*, *FGFR1*, *FGF2* and *TGFB1* in *longissimus thoracis* (A) and *masseter* (B) muscles of Pirenaica and Friesian bulls..... 156

Table 7.6. Mean, Minimum, maximum, and CV of the Cq values, estimated standard deviations for inter-animal variation, processing steps (Sampling, RT and qPCR) and total variance for myogenic genes *Myf5*, *MyoD* and *MyoG* in *longissimus thoracis* (A) and *masseter* (B) muscles of Pirenaica and Friesian bulls..... 157

Table 7.7. Mean, Minimum, maximum, and CV of the Cq values, estimated standard deviations for inter-animal variation, processing steps (Sampling, RT and qPCR) and total variance for genes *LEP*, *ADIPOQ*, *Mstn* and *Zfp423* in *longissimus thoracis* (A) and *masseter* (B) muscles of Pirenaica and Friesian bulls..... 158



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Número de explotaciones de vacuno Pirenaico por comunidades autónomas. ....	26
Figura 2.2. Número de explotaciones de ganado Frisón por provincia. ....	27
Figura 2.4. Proceso de diferenciación de células madre mesenquimales en miotubos. Adaptado de Rios <i>et al.</i> , (2002). ....	32
Figura 2.5 Principales factores que influyen en la determinación y diferenciación de los de las células madre mesenquimales en miocitos. Adaptado de Rios <i>et al.</i> (2002) y Apponi <i>et al.</i> (2011). ....	33
Figura 2.6. Algunos de los principales factores implicados en el proceso de diferenciación de los miotubos y diferenciación de los miofibras. Adaptado de Olson y Klein (1994) ....	34
Figura 2.7. Expresión de los factores de regulación miogénica a lo largo de la diferenciación del tejido muscular. Adaptado de Bentzinger <i>et al.</i> (2012). ....	34
Figura 2.8. Estructura general de las fibras de colágeno. ....	37
Figura 2.9. Formación de adipocitos en los cuatro principales depósitos adiposos en bovino Adaptado de Du <i>et al.</i> , (2013). ....	43
Figura 2.10. Fases principales del proceso de diferenciación del adipocito. Adaptado de Christodoulides <i>et al.</i> (2008). ....	44
Figura 2.11. Algunos de los principales factores involucrados en el proceso de diferenciación de los adipocitos. ....	45
Figura 2.12. Divergencia de las células madre mesenquimáticas en el linaje miogénico y fibro-adipogénico durante el desarrollo muscular fetal (Adaptado de Du <i>et al.</i> , 2010b). ....	53
Figura 2.13. Relación entre algunos de los principales factores involucrados en la adipogénesis, miogénesis y fibrogénesis. ....	54
Figure 3.1. Experimental design. ....	78

Figure 5.1. Adipocyte size distribution of the tissues studied. A) adipocyte size distribution in the muscles <i>longissimus thoracis</i> and <i>semitendinosus</i> ; B) adipocyte size distribution in the muscles <i>masseter</i> and <i>sternomandibularis</i> ; C) adipocyte size distribution in the subcutaneous adipose tissue. ....	106
Figure 5.3. Standard deviations contributing for the sampling-processing steps expressed as percentages. <i>PPARG</i> = <i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math></i> ; <i>CEBPA</i> = <i>CCAAT/enhancer-binding protein <math>\alpha</math></i> ; <i>FABP4</i> = <i>fatty acid binding protein 4</i> ; <i>WNT10B</i> = <i>wingless-type MMTV integration site family 10B</i> ; <i>ACTB</i> = <i><math>\beta</math>-actin</i> <i>TOP2B</i> = <i>Topoisomerase II-beta</i> .....	115
Figure 6.1. Adipocyte cell-size distribution in <i>longissimus thoracis</i> (panel A) and <i>masseter</i> (panel B) muscles in Pirenaica and Friesian bulls. ....	132
Figure 6.2. Standard deviations contributing for the sampling-processing steps expressed as percentages in <i>longissimus thoracis</i> and <i>masseter</i> muscles of Pirenaica and Friesian bulls.....	138
Figure 7.1. Standard deviations contributing for the sampling-processing steps expressed as percentages in <i>FN1</i> , <i>FGFR1</i> , <i>FGF2</i> , <i>TGF<math>\beta</math>1</i> , <i>ACTB</i> and <i>TOP2B</i> genes of <i>longissimus thoracis</i> and <i>masseter</i> muscles in Pirenaica and Friesian bulls. ....	160
Figure 7.2. Standard deviations contributing for the sampling-processing steps expressed as percentages in <i>Myf5</i> , <i>MyoD</i> , <i>MyoG</i> , <i>ACTB</i> and <i>TOP2B</i> genes of <i>longissimus thoracis</i> and <i>masseter</i> muscles in Pirenaica and Friesian bulls. ....	161
Figure 7.3. Standard deviations contributing for the sampling-processing steps expressed as percentages in <i>LEP</i> , <i>ADIPOQ</i> , <i>Mstn</i> , <i>Zfp423</i> , <i>ACTB</i> and <i>TOP2B</i> genes of <i>longissimus thoracis</i> and <i>masseter</i> muscle in Pirenaica and Friesian bulls.....	162
Figura 8.1. Adipogénesis, fibrogénesis y miogénesis y posible relación de algunos factores implicados en estos procesos. Adaptado de varios autores (Christodoulides <i>et al.</i> , 2008; Romacho <i>et al.</i> , 2014).....	177
Figura 8.2. Diferencias en los valores de expresión normalizados entre los músculos <i>longissimus thoracis</i> y <i>masseter</i> para terneros de raza Pirenaica y Frisona. ....	185



Figura 8.3. Diferencias en los valores de expresión normalizados entre terneros de las razas Pirenaica y Frisona en los músculos *longissimus thoracis* y *masseter*..... 187



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACACA	<i>AcetilCoA carboxilasa alfa</i>	<i>Acetyl-CoA carboxylase alpha</i>
ACACB	<i>AcetilCoA carboxilasa beta</i>	<i>Acetyl-CoA carboxylase beta</i>
ACC	<i>AcetilCoA carboxilasa sintasa</i>	<i>Acetyl-CoA carboxylase synthase</i>
ACTB	<i><math>\beta</math>-actina</i>	<i><math>\beta</math>-actin</i>
ADIPOQ	Adiponectina	Adiponectin
ADN/DNA	Ácido desoxiribonucleico	Desoxiribonucleic acid
AFNA	Asociación de Criadores de Ganado	Friesian Livestock Breeders
	Vacuno Frisón de Navarra	Association of Navarre
AFRIARA	Asociación Frisona Aragonesa	Friesian Livestock Breeders
		Association of Aragón
ANOVA	Análisis de la varianza	Analysis Of Variance
ARN	Ácido ribonucleico	Ribonucleic Acid
ARPIEL	Asociación alavesa de criadores de ganado bovino de raza Pirenaica	Pirenaica Livestock Breeders
		Association of Alava
ASAPI	Asociación Aragonesa de Ganaderos de Bovinos de Raza Pirenaica	Pirenaica Livestock Breeders
		Association of Aragon
ASGAPIR	Asociación de Criadores de Ganado Pirenaico de Bizkaia	Pirenaica Livestock Breeders
		Association of Vizcaya
ASPIC	Associació de criadors de vacú de raça pirenaica de Catalunya	Pirenaica Livestock Breeders
		Association of Catalonia
ASPINA	Asociación de Criadores de Ganado Vacuno Pirenaico de Navarra	Pirenaica Livestock Breeders
		Association of Navarre
BMP	<i>Proteína morfogénica ósea</i>	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
BOE	Boletín Oficial del Estado	Official State Gazette
CEBPA	<i>Proteína de unión a la secuencia CCAAT alfa</i>	CCAAT/Enhancer Binding
		<i>Protein Alpha</i>
CFN	Comunidad Foral de Navarra	Navarre Foral Community
CMM	Células madre mesenquimales	Mesenchimal Stem Cells
CNL3	<i>Batenina</i>	<i>Battenin</i>

Col19a1	Procolágeno tipo XIX alfa 1	Collagen Type XIX Alpha 1 Chain
Col1a2	Procolágeno tipo I alfa 2	Collagen Type I Alpha 2 Chain
CONAFE	Confederación de Asociaciones de Frisona Española	Confederation of Friesian Livestock Spanish Associations
CONASPI	Confederación de asociaciones de ganado Vacuno Pirenaico	Confederation of Pirenaica Livestock Spanish Associations
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo	Connective tissue growth factor
EFRIFE	Federación Frisona de Euskadi	Friesian Livestock Federation of Basque Country
FABP	Proteína de unión a ácidos grasos	Fatty Acid Binding Protein
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura	Food and agriculture organisation of the united nations
FAS	Ácido graso sintasa	Fatty Acid Synthase
FASN	Gen codificante para ácido graso sintasa	Fatty Acid Synthase gene
FGF	Factores de crecimiento de los fibroblastos	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Receptor de factores de crecimiento de los fibroblastos	Fibroblast Growth Factor Receptor
FN1	Fibronectina	Fibronectin
GIM/IMF	Grasa intramuscular	Intramuscular Fat
GSK3	Glicógeno sintasa Kinasa 3	Glycogen synthase kinase 3
GLUT4	Transportador de glucosa tipo 4	Glucose transporter type 4
HEBE	Asociación guipuzcoana de criadores de ganado bovino de raza Pirenaica	Pirenaica Livestock Breeders Association of Guipúzcoa
HSC	Hormona sensible a lipasas	Hormone-sensitive lipase
IGP	Indicación Geográfica protegida	Protected Geographical Indication
IM	Intramuscular	Intramuscular
LEP	Leptina	Leptin

LPL	<i>Lipoproteína lipasa</i>	<i>Lipoproteinlipase</i>
LT	<i>Longissimus thoracis</i>	<i>Longissimus thoracis</i>
MAPAMA	Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente	
MEC	Matriz extracelular	Extracellular Matrix
MEF	Factor Potenciador Específico de Miocitos	Myocyte enhancer factor
MRF	Factor de regulación miogénica	Myogenic regulatory factors
MS	<i>Masseter</i>	<i>Masseter</i>
Mstn	<i>Miostatina</i>	<i>Myostatin</i>
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados	Monounsaturated fatty acid
Myf5	<i>Factor miogénico 5</i>	<i>Myogenic factor 5</i>
MyHC	Cadena pesada de la miosina	Myosin Heavy Chain
MyoD	<i>Proteína 1 de diferenciación miogénica</i>	<i>Myogenic Differentiation 1</i>
MyoG	<i>Miogenina</i>	<i>Myogenin</i>
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica	National Center of Biotechnology Information
NEFA	Acidos grasos no esterificados	Non esterified fatty acids
OMS	Organización Mundial de la Salud	World Health Organization
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa	Polymerase chain reaction
PPAR	<i>Receptor activado por proliferador de peroxisomas</i>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPIA	<i>Peptidopropil isomerasa A</i>	<i>Peptidylprolyl isomerase A</i>
qPCR	PCR cuantitativa	Quantitative PCR
RFLPO	<i>Proteína grande ribosomal PO</i>	<i>Ribosomal protein large PO</i>
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real	Real time reverse transcription polymerase chain reaction
SAT	Tejido Adiposo Subcutáneo	Subcutaneous adipose tissue
SC	Subcutáneo	Subcutaneous
SCD	<i>Desaturasa de estearoil-CoA</i>	<i>Stearoyl-CoA desaturase</i>
SFA	Ácidos grasos saturado	Saturated Fatty Acid

SITRAN	Sistema Integral de trazabilidad animal	Animal Traceability Integral System
SREBF	Factores de transcripción de proteínas de unión a elementos reguladores de esteroles	Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1
SREBP	Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroles	Sterol regulatory element-binding proteins
SM	Sternomandibularis	Sternomandibularis
ST	Semitendinosus	Semitendinosus
TGFB1	Factor de crecimiento transformante B1	Transforming Growth Factor B1
TOP2B	Topoisomerasa II Beta	Topoisomerase II-beta
WNT	Wingless	Wingless
WNT10b	Wingless-Int10b	Wingless-Int10b
Zfp423	Zinc Finger Protein	Zinc finger protein

**ABSTRACT / RESUMEN**





## ABSTRACT

Intramuscular fat (IMF) or marbling is essential for the palatability of beef, being a major factor that affects the meat quality. The IMF content can be related to the different muscle anatomical site, their divergent functionalities and the metabolism or the fiber type presented by the muscles. In addition, in different cattle breeds, the IMF develops at different rate during growth, leading to different IMF accumulation and marbling scores at slaughter. The IMF development occurs within close proximity to muscle fibers and connective tissue. Therefore, since fibroblast, myocytes and adipocytes share a common mesenchymal origin, signaling and cross-talk between myocytes, fibrogenic cells and adipocytes may influence the IMF deposition.

The aim of the present thesis was to study the development of IMF in different muscles in two breeds of cattle with distinct precocity in the accumulation of IMF, and the expression of factors involved in the formation of adipocytes (adipogenesis), muscle (myogenesis) and connective tissue (fibrogenesis).

With this purpose, the first trial was focused on studying the IMF deposition and the expression of key adipogenic genes in different muscles of Pirenaica bulls, a beef oriented breed with low tendency to accumulate IMF. Samples of *longissimus thoracis* (LT), *semitendinosus* (SM), *masseter* (MS), *sternomandibularis* (ST) and subcutaneous adipose tissue (SAT) of Pirenaica bulls (n=4) were collected for IMF, protein and moisture quantification, adipocyte size distribution analysis and quantification of *PPARG*, *CEBPA*, *FABP4* and *WNT10B* gene expression. A greater IMF content was observed in MS and SM muscles, which had a bimodal adipocyte size distribution while it was unimodal in the muscles LT and ST, with lower IMF amount. These results suggested that the different IMF accretion in the muscles studied might be related to different rates of hyperplasia and hypertrophy and that IMF might develop later in LT and ST muscles. The former differences were not mirrored by the expression of the genes analyzed, with the exception of *FABP4* gene, which was expressed at higher level in LT than in MS and ST muscles. When comparing IMF and SAT gene expression the expression of *PPARG*, *CEBPA* and *FABP4* was higher in the SAT, in agreement with bigger cell size observed in that tissue.

Aiming to compare the muscles between breeds, in the second and third trials, Friesian bulls (n=4) were sampled in addition to the Pirenaica bulls. *LT* and *MS* muscles were selected as representative and IMF, protein, moisture, total collagen and soluble collagen contents were quantified and the adipocyte size distribution analysis was performed. Then, the expression of genes involved in adipocyte formation and adipokines (*PPARG*, *CEBPA*, *FABP4*, *WNT10B*, *Zfp423*, *ADIPOQ*, *LEP*), myogenic genes and myokines (*Myf5*, *MyoD*, *MyoG*, *Mstn*), and fibrogenic genes (*FN1*, *FGFR1*, *FGF2*, *TGFB1*) was analysed. In both breeds, *LT* muscle presented a unimodal distribution of the adipocyte size although Friesian bulls presented a bigger adipocyte mean size in accordance with their higher fat content. The *MS* muscle showed a bimodal adipocyte size distribution also in both breeds. However, in this case no differences between adipocyte size and IMF content were detected. When comparing both muscles in each breed, the Pirenaica bulls presented a greater IMF in the *MS* muscle compared to *LT*. Nevertheless, despite presenting different adipocyte size distribution, *LT* and *MS* muscles showed similar IMF content in Friesian bulls.

The gene expression of the adipogenic genes *CEBPA*, *WNT10B* and the adipokine *LEP* did not present differences between the muscles and breeds analysed. However, the *PPARG* gene expression was higher in the *LT* and *MS* muscles of Pirenaica breed in contrast with *FABP4* which expression was higher in both muscles of Friesian bulls. On the other hand, comparing the two muscles in the Friesian bulls, the gene *Zfp423* was overexpressed in the *LT* muscle while the *MS* muscle presented a higher expression of *ADIPOQ*. The genes related to fibrogenesis *FN1*, *FGFR1*, *FGF2* and *TGFB1* showed a similar expression between the muscles and breeds studied, which agreed with the lack of differences observed in the total and soluble collagen content. Finally, attending to the myogenic genes and the myokine studied, *MyoG* did not present differences in the Pirenaica and Friesian bulls and the *LT* and *MS* muscles. However, in the *MS* muscle the *Myf5* expression was greater in Friesian bulls than in Pirenaica breed and expression of *MyoD* was upregulated in the *LT* muscle of both breeds. The myokine *Mstn* expression was higher in both muscles of Pirenaica breed compared with Friesian bulls and, comparing both muscles in Friesian bulls, the *Mstn* gene was overexpressed in the *LT* muscle.

Real time reverse transcription PCR (RT-qPCR) used to quantify the changes in gene expression of the present thesis, presents a wide range of analytical situations, apart from the animal, the tissue or the experimental treatment assayed that may affect gene expression results. Therefore, in order to optimize the experimental designs and achieve a more accurate analysis of the results, a variability analysis of the different analytical factors that affect RT-qPCR results was performed in each study. The variability analysis indicated that the analytical factors that add higher variability to the gene expression were the replicate in the sampling and the RT. Therefore, it would be appropriate to include those replicates in the design of future experiments taking into account the variability due to this factors.



## RESUMEN

En vacuno, la grasa intramuscular (GIM) o veteadado es esencial para la palatabilidad de la carne, por lo tanto es un factor importante que afecta a la calidad de ésta. El contenido en GIM puede estar relacionado con la distinta localización anatómica de los músculos, las funcionalidades de los mismos e, incluso, por su metabolismo o tipo de fibra. También es conocido que en distintas razas, la GIM se desarrolla de forma diferente durante el crecimiento, dando lugar a distintos grados de acumulación de GIM y veteadado en el momento del sacrificio de los animales. El desarrollo de la GIM se produce en un entorno característico, embebida entre fibras musculares y tejido conectivo. Dado que los adipocitos, los miocitos y los fibroblastos, es decir las células características de los tejidos adiposo, muscular y conectivo respectivamente, comparten un origen común, las vías señalización y la regulación de la formación de dichos tejidos, y no solo las implicadas con el tejido graso, podrían influir en la deposición de la GIM.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el desarrollo de la GIM en distintos músculos de dos razas de ganado vacuno con distinta precocidad en la acumulación de GIM, además de la expresión génica de factores implicados en la formación de adipocitos (adipogénesis), músculo (miogénesis) y tejido conectivo (fibrogénesis).

Con este propósito, el primer ensayo se centró en estudiar la GIM y la expresión de genes adipogénicos clave en distintos músculos de terneros Pirenaicos, una raza orientada a la producción de carne que presente una baja tendencia al engrasamiento y en particular para la acumulación de GIM. Para ello, se cuantificó el porcentaje de GIM, proteína y humedad en muestras de los músculos *longissimus thoracis* (LT), *semitendinosus* (SM), *masseter* (MS), *sternomandibularis* (ST) y en el tejido adiposo subcutáneo (SC) de terneros de raza Pirenaica (n = 4). También se estudió la distribución de tamaño de los adipocitos y la expresión génica de genes clave en la adipogénesis (*PPARG*, *CEBPA*, *FAPB4* y *WNT10B*). En los músculos MS y SM se observó un mayor contenido en GIM, en los que la distribución del tamaño de los adipocitos fue bimodal mientras que en los músculos LT y ST, con menor contenido en grasa intramuscular, fue unimodal. Esto sugiere que la diferente acumulación de GIM por parte de los músculos estudiados podría estar relacionada con diferencias en la hiperplasia e hipertrofia y con un desarrollo

más tardío de la GIM en los músculos *LT* y *ST*. Estas diferencias, sin embargo, no fueron reflejadas por la expresión de los genes analizados, a excepción del gen *FABP4*, que se expresó más en el músculo *LT* que en los músculos *MS* y *SM*. Al comparar la expresión de los genes estudiados en el depósito intramuscular y en el *SC*, la expresión de *PPARG*, *CEBPA* y *FABP4* fue mayor en el *SC*, lo que concordaba con el mayor tamaño de los adipocitos observado en este depósito.

Con el fin de realizar una comparación entre distintas razas además de entre músculos, en el segundo y tercer ensayo, además de la raza Pirenaica se estudió también la raza Frisona ( $n = 4$ ). Se seleccionaron como representativos los músculos *LT* y *MS* de ambas razas y se procedió a cuantificar el contenido de GIM, proteína, humedad, colágeno total y colágeno soluble así como al análisis de la distribución de tamaño de los adipocitos. Además, se analizó la expresión de genes implicados en la formación de adipocitos y adipoquinas (*PPARG*, *CEBPA*, *FABP4*, *WNT10B*, *Zfp423*, *ADIPOQ*, *LEP*), de genes miogénicos y mioquinas (*Myf5*, *MyoD*, *MyoG*, *Mstn*), y de los genes fibrogénicos (*FN1*, *FGFR1*, *FBF1*, *FGF2*, *TGFB1*). En ambas razas, el músculo *LT* presentó una distribución unimodal de los adipocitos, aunque éstos fueron de un tamaño medio mayor en la raza Frisona de acuerdo con su mayor contenido en grasa. Por otro lado, igualmente en ambas razas, el músculo *MS* presentó una distribución bimodal; en este caso no se observaron diferencias en el tamaño de los adipocitos ni en la cantidad de grasa. Comparando cada raza de forma independiente, en los terneros de raza Pirenaica el contenido de GIM fue mayor en el músculo *MS* en comparación con *LT*. En terneros Frisones sin embargo, a pesar de presentar diferente distribución del tamaño de los adipocitos, los músculos *LT* y *MS*, presentaron un contenido similar de GIM.

Los resultados del estudio de la expresión génica indicaron que los genes adipogénicos *CEBPA*, *WNT10B* y la adipoquina *LEP* no presentaron diferencias de expresión entre los músculos y las razas analizadas. Sin embargo, la expresión del gen *PPARG* fue mayor en los músculos *LT* y *MS* de los terneros de raza Pirenaica, al contrario que el gen *FABP4* cuya expresión fue mayor en ambos músculos de terneros Frisones. Por otra parte, comparando los dos músculos en terneros Frisones, el gen *Zfp423* se expresó más en el músculo *LT* mientras que hubo una mayor expresión de la adipoquina *ADIPOQ* en el

músculo MS. Los genes relacionados con la fibrogénesis *FN1*, *FGFR1*, *FGF2* y *TGFB1* mostraron una expresión similar entre los músculos y razas analizadas, al igual que se observó que no había diferencias en el contenido de colágeno total y soluble. Por último, atendiendo a la expresión de los genes miogénicos y la mioquina estudiados, *MyoG* no presentó diferencias entre las razas Pirenaica y Frisona y los músculos *LT* y *MS*. Sin embargo, para el músculo *MS* de terneros Frisones, la expresión de *Myf5* resultó ser mayor en comparación con los terneros Pirenaicos mientras que la expresión de *MyoD* fue mayor en el músculo *LT* de ambas razas. La expresión de la mioquina *Mstn* fue mayor en los dos músculos de la raza Pirenaica mientras que para los terneros Frisones, se expresó más en el músculo *LT* que en el *MS*.

Los resultados de expresión génica cuantificados por medio de la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) utilizada en el presente trabajo, pueden verse afectados por distintos factores, aparte del animal, del tejido o del tratamiento experimental ensayado, relacionados con la variación asociada al trabajo experimental. Por lo tanto, en orden a optimizar el diseño experimental y lograr un análisis más preciso de los resultados, en cada estudio se realizó un análisis de variabilidad de los diferentes factores que afectan los resultados de RT-qPCR. Este estudio indicó que los factores analíticos que aportan mayor variabilidad a la expresión génica fueron la muestra (réplica en el muestreo) y la etapa de RT. Por lo tanto, sería apropiado diseñar los futuros experimentos teniendo en cuenta la variabilidad debida a estos factores.





**CHAPTER 1**  
**INTRODUCCIÓN**



## INTRODUCCIÓN

La grasa intramuscular (GIM) también denominada veteado, es de gran importancia a la hora de determinar la calidad de la carne (Du *et al.*, 2010; Albrecht *et al.*, 2011). Su cantidad y distribución son altamente variables y dependen tanto de factores ambientales y genéticos como del manejo o alimentación del animal, la edad de sacrificio o raza del mismo, el tipo de músculo y su localización anatómica, el tipo de fibra, sus propiedades contráctiles y el metabolismo predominante (Oddy *et al.*, 2001; Renand *et al.*, 2003; Bruns *et al.*, 2004; Albrecht *et al.*, 2006; Moreno-Sanchez *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2015; Listrat *et al.*, 2016; Albrecht *et al.*, 2017). Durante años la selección de los animales destinados para la producción de carne ha favorecido el crecimiento muscular mientras que de forma paralela se han reducido los depósitos grasos (Hocquette *et al.*, 2012). Actualmente, en sistemas de producción que dependen de razas con una baja tendencia a acumular GIM, esto puede conducir a que la calidad de carne se vea comprometida, siendo este el caso de la raza Pirenaica, la más utilizada en los sistemas de producción de carne de vacuno en la Comunidad Foral de Navarra (Soret *et al.*, 2016). Esta raza es apreciada por su buena aptitud cárnica aunque se caracteriza por tener una deposición de grasa inferior a la considerada apropiada para que la carne presente las propiedades organolépticas deseadas por los consumidores, que se encuentra entre el 3 y el 4% (Savell y Cross, 1988, Indurain *et al.*, 2010).

El tejido adiposo intramuscular (IM) presenta una serie de peculiaridades que lo diferencian de los otros principales tejidos adiposos presentes en los animales como el depósito visceral, el subcutáneo o el intermuscular. Estas diferencias atienden a aspectos como el potencial proliferativo de los preadipocitos, la respuesta a factores adipogénicos e, incluso, a su metabolismo específico (Gardan *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Hausman *et al.*, 2008; Rajesh *et al.*, 2010). Además, los distintos depósitos grasos del animal no acumulan la grasa de forma simultánea, siendo el depósito visceral el primero en ser formado, seguido después por el subcutáneo, el intermuscular y, por último, por el IM (Robelin, 1981; Hood y Allen, 1973; Hocquette *et al.*, 2010; Taga *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2013). Parte de estas diferencias características que presenta el depósito graso IM se deben al entorno de fibras musculares y tejido conectivo en el que se desarrolla.

Estas diferencias, unidas al hecho de que las células formadoras del músculo, tejido conectivo y grasa derivan de las mismas células madres mesenquimales (Du *et al.*, 2010; Tang y Lane, 2012), conducen a considerar que la formación de GIM podría estar ligada a factores relacionados con el desarrollo de otros tejidos además del adiposo, como el muscular y el conectivo, y a la existencia de una compleja comunicación de regulación recíproca entre ellos (Bonnet *et al.*, 2010). Por lo tanto, el estudio y conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la GIM podría ayudar a la identificación de estrategias que permitan modificar la proporción entre el músculo y la grasa, mejorando la calidad de la carne y adaptándola a las demandas del consumidor, con el consiguiente impacto económico positivo (Roberts *et al.*, 2015).

En el presente trabajo el objetivo fue estudiar la expresión de los genes relacionados con el desarrollo de la grasa, el músculo y el tejido conectivo mediante RT-qPCR, así como del contenido en GIM y la distribución del tamaño de los adipocitos, en diferentes músculos en dos razas caracterizadas por tener diferente precocidad en el engrasamiento.

## REFERENCIAS

- Albrecht E, Gotoh T, Ebara F, Xu JX, Viergutz T, Nurnberg G, *et al.* Cellular conditions for intramuscular fat deposition in Japanese Black and Holstein steers. *Meat Sci.* 2011;89(1):13-20. 10.1016/j.meatsci.2011.03.012.
- Albrecht E, Schering L, Liu Y, Komolka K, Kühn C, Wimmers K, *et al.* 0786 Factors influencing bovine intramuscular adipose tissue development and cellularity. *J Anim Sci.* 2017;94(supplement5):378.
- Albrecht E, Teuscher F, Ender K, Wegner J. Growth- and breed-related changes of marbling characteristics in cattle. *J Anim Sci.* 2006;84(5):1067-75.
- Bonnet M, Cassar-Malek I, Chilliard Y, Picard B. Ontogenesis of muscle and adipose tissues and their interactions in ruminants and other species. *Animal.* 2010;4(7):1093-109. 10.1017/S1751731110000601.
- Bruns KW, Pritchard RH, Boggs DL. The relationships among body weight, body composition, and intramuscular fat content in steers. *J Anim Sci.* 2004;82(5):1315-22.

- Du M, Huang Y, Das AK, Yang Q, Duarte MS, Dodson MV, *et al.* Meat Science and Muscle Biology Symposium: manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. *J Anim Sci.* 2013;91(3):1419-27. 10.2527/jas.2012-5670.
- Du M, Tong J, Zhao J, Underwood KR, Zhu M, Ford SP, *et al.* Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *J Anim Sci.* 2010;88(13 Suppl):E51-60. 10.2527/jas.2009-2311.
- Gardan D, Gondret F, Louveau I. Lipid metabolism and secretory function of porcine intramuscular adipocytes compared with subcutaneous and perirenal adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(2):E372-80. 10.1152/ajpendo.00482.2005.
- Hausman GJ, Poulos SP, Pringle TD, Azain MJ. The influence of thiazolidinediones on adipogenesis in vitro and in vivo: potential modifiers of intramuscular adipose tissue deposition in meat animals. *J Anim Sci.* 2008;86(14 Suppl):E236-43. 10.2527/jas.2007-0219.
- Hocquette JF, Botreau R, Picard B, Jacquet A, Pethick DW, Scollan ND. Opportunities for predicting and manipulating beef quality. *Meat Sci.* 2012;92(3):197-209. 10.1016/j.meatsci.2012.04.007.
- Hocquette JF, Gondret F, Baeza E, Medale F, Jurie C, Pethick DW. Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal.* 2010;4(2):303-19. 10.1017/S1751731109991091.
- Hood RL, Allen CE. Cellularity of bovine adipose tissue. *J Lipid Res.* 1973;14(6):605-10.
- Indurain G, Beriain MJ, Sarries MV, Insausti K. Effect of weight at slaughter and breed on beef intramuscular lipid classes and fatty acid profile. *Animal.* 2010;4(10):1771-80. 10.1017/S1751731110000923.
- Listrat A, Lebreton B, Louveau I, Astruc T, Bonnet M, Lefaucheur L, *et al.* How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality. *ScientificWorldJournal.* 2016;2016:3182746. 10.1155/2016/3182746.
- Moreno-Sanchez N, Rueda J, Carabano MJ, Reverter A, McWilliam S, Gonzalez C, *et al.* Skeletal muscle specific genes networks in cattle. *Funct Integr Genomics.* 2010;10(4):609-18. 10.1007/s10142-010-0175-2.

- Oddy VH, Harper GS, Greenwood PL, McDonagh MB. Nutritional and developmental effects on the intrinsic properties of muscles as they relate to the eating quality of beef. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 2001;41(7):921-42. <http://dx.doi.org/10.1071/EA00029>.
- Rajesh RV, Heo GN, Park MR, Nam JS, Kim NK, Yoon D, *et al.* Proteomic analysis of bovine omental, subcutaneous and intramuscular preadipocytes during in vitro adipogenic differentiation. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*. 2010;5(3):234-44. 10.1016/j.cbd.2010.06.004.
- Renand G. L'amélioration génétique de la qualité de la viande dans les différentes espèces: situation actuelle et perspectives à court et moyen termes. *VIANDES ET PRODUITS CARNES*. 2003;22:G-CONF1.
- Robelin J. Cellularity of bovine adipose tissues: developmental changes from 15 to 65 percent mature weight. *J Lipid Res*. 1981;22(3):452-7.
- Roberts SL, Lancaster PA, DeSilva U, Horn GW, Krehbiel CR. Coordinated gene expression between skeletal muscle and intramuscular adipose tissue in growing beef cattle. *J Anim Sci*. 2015;93(9):4302-11. 10.2527/jas.2015-8886.
- Savell JW, Cross HR. The Role of Fat in the Palatability of Beef, Pork, and Lamb. In: Council NR, Agriculture B, Products CTOINAA, editors. *Designing Foods: Animal Product Options in the Marketplace*: National Academies Press; 1988.
- Soret B, Mendizabal JA, Arana A, Alfonso L. Expression of genes involved in adipogenesis and lipid metabolism in subcutaneous adipose tissue and longissimus muscle in low-marbled Pirenaica beef cattle. *Animal*. 2016;10(12):2018-26. 10.1017/S175173111600118X.
- Taga H, Bonnet M, Picard B, Zingaretti MC, Cassar-Malek I, Cinti S, *et al.* Adipocyte metabolism and cellularity are related to differences in adipose tissue maturity between Holstein and Charolais or Blond d'Aquitaine fetuses. *J Anim Sci*. 2011;93(3):711-21. 10.2527/jas.2010-3234.
- Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:715-36. 10.1146/annurev-biochem-052110-115718.

- Zhou X, Li D, Yin J, Ni J, Dong B, Zhang J, *et al.* CLA differently regulates adipogenesis in stromal vascular cells from porcine subcutaneous adipose and skeletal muscle. *J Lipid Res.* 2007;48(8):1701-9. 10.1194/jlr.M600525-JLR200.





**CHAPTER 2.**  
**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.**



## 1. CARNE DE VACUNO

### 1.1. Situación del sector de vacuno de carne

En el conjunto de países de la Unión Europea, España se mantiene en el quinto lugar en lo que se refiere a censo y producción de vacuno de carne, situándose por detrás de países con una larga tradición en este sector como Francia, Alemania, Reino Unido e Irlanda. En 2016, la cabaña vacuna española ascendió a un total de 6,3 millones de cabezas según los datos del Sistema Integral de Trazabilidad Animal (SITRAN) y su valor de mercado supera ya los 2.600 millones de euros (MAPAMA, 2015).

En España, en el año 2015, el sector de vacuno de carne supuso aproximadamente un 6% de la Producción final Agraria y un 16,49% de la Producción Final Ganadera siendo la cuarta producción ganadera en cuanto a importancia económica, precedido por los sectores porcino, lácteo y avícola, según los datos recopilados por el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA). La comunidad autónoma que presenta mayor porcentaje de ganado vacuno es Castilla y León con un 21%, seguido de Galicia (15%), Extremadura (13%), Cataluña (11%) y Andalucía (8%) (MAPAMA, 2015). Esto supone que más del 70% del ganado bovino se localiza en las comunidades autónomas citadas, mientras que el censo registrado en la Comunidad Foral de Navarra (CFN) asciende a un 2% del total de la cabaña bovina española, situándose en décimo lugar junto con País Vasco y Madrid.

En noviembre del 2016, en la CFN había alrededor de 100.000 cabezas de ganado vacuno según los datos de la Encuesta Ganadera publicada por el MAPAMA (MAPAMA, 2016), lo que supone un 9% del total del efectivo ganadero de la comunidad. En las explotaciones destinadas a la producción de carne de vacuno en la CFN, más del 50% de las cabezas de ganado son animales de raza Pirenaica, quedando muy por delante de otras razas como la Charolesa o la Blonde de Aquitania (Memoria Actividades ASPINA 2014). Por otro lado, hay una importante contribución al sector cárnico, principalmente de terneros, procedente de las explotaciones de vacuno lechero, en las que la raza más utilizada en España por su excelente aptitud lechera es la raza Frisona (Memoria AFNA 2015).

El hecho de que en España el número de explotaciones en el sector vacuno mantenga una tendencia descendente en los últimos 10 años y que esta disminución no se correlacione totalmente con una caída tan acusada de los censos en la cabaña bovina, es un indicador de la reconversión que se está llevando a cabo en el sector, produciéndose una concentración y un aumento de tamaño de las explotaciones.

## 1.2. Calidad de la carne

El término calidad es un concepto subjetivo, relativo y dinámico, por lo que resulta difícil de definir. Según la perspectiva de los distintos eslabones de la cadena de valor, que se inicia en la explotación ganadera y termina en el punto de venta donde el consumidor adquiere la carne, tiene diversas acepciones. La calidad de la carne de vacuno ha sido objeto de diversos estudios y, de forma general, puede considerarse como aquellas características de la carne que satisfacen a los consumidores (Nuernberg *et al.*, 2005; Serra *et al.*, 2008; Hocquette *et al.*, 2012; Picard *et al.*, 2015), idea que ya en 1952 fue postulada por Hammond, quien definió la calidad como “Aquello por lo cual el consumidor está dispuesto a pagar un precio superior de forma regular y consistente” (Hammond, 1952).

Los criterios que definen la calidad de la carne bovina hacen referencia a diferentes aspectos como su composición (proporción de los distintos tejidos: muscular, adiposo, conjuntivo), su valor nutritivo en cuanto al aporte de proteínas, vitaminas y otros elementos esenciales que ésta contiene o a factores de palatabilidad tales como su aspecto, olor, firmeza, jugosidad, terneza y sabor. Mientras que la calidad nutritiva de la carne es objetiva, la calidad “como producto comestible”, tal y como es percibida por el consumidor, es subjetiva. Es aceptado que una carne considerada “de calidad” debe ser segura (calidad higiénica, trazabilidad), sana (calidad nutricional), satisfactoria (calidad organoléptica) y ofrecer facilidad de servicio (facilidad de uso, capacidad de procesamiento y precio) (Joo *et al.*, 2013; Listrat *et al.*, 2016).

En cuanto a la calidad higiénica de la carne, ésta debe ser inocua e idónea para el consumo humano; así, los programas sobre higiene de la carne deberán tener como principal objetivo la protección de la salud pública además de basar sus decisiones en la evaluación científica sobre los posibles riesgos para la salud humana y considerar todos

los peligros alimenticios, identificados en investigaciones, monitoreo y otras actividades de relevancia (FAO, 2007).

La trazabilidad es la capacidad para localizar los alimentos a través de una o varias de las etapas específicas de su producción, transformación y distribución. Los sistemas de identificación del ganado y rastreabilidad de la carne fueron introducidos en los distintos países de la Unión Europea como respuesta al problema de la encefalopatía espongiforme bovina. Un buen sistema de rastreabilidad o trazabilidad proporciona información precisa sobre la procedencia, sexo, edad, raza y movimientos de un determinado animal y registra los tratamientos veterinarios que recibe. Los sistemas de rastreabilidad son un medio importante para prevenir la propagación de enfermedades animales y mejorar la garantía de salubridad alimentaria en general.

En vacuno, la calidad nutricional de la carne es diferente en función de la edad de sacrificio del animal y la pieza de consumo. En términos generales, 100 g de carne de vacuno contienen 20,7 g de proteína, 5,4 g de lípidos totales, 2,1 mg de hierro, 1,8 mg de magnesio, etc., además de vitaminas A, B<sub>12</sub>, C, D y E en distintas proporciones. Por otro lado, la calidad organoléptica de la carne, que ha sido ampliamente estudiada, hace referencia como se ha indicado a factores como la terneza sabor, jugosidad y otros atributos de la carne (Hocquette *et al.*, 1998) que influyen en la calidad final de la misma y que se ven influidos por factores como la estructura muscular o las características de las fibras musculares (color, capacidad de retención de agua, grasa o textura) (Totland *et al.*, 1988), la composición química de la carne (composición de ácidos grasos y otros compuestos volátiles), los cambios *postmortem* en los tejidos musculares (tipo de preparación para el consumo), el estrés y los efectos previos al sacrificio, el manejo, el procesamiento y el almacenamiento del producto, etc. (Joo *et al.*, 2013).

Se han realizado numerosos estudios para determinar los factores que determinan la calidad de la carne en varias razas de ganado bovino, incluidas las razas Pirenaica y Frisona (Lizaso *et al.*, 2011). Varios de estos estudios coinciden en afirmar que la grasa intramuscular (GIM) es uno de los principales factores determinantes de la calidad de la carne (Wood *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2010a; Albrecht *et al.*, 2011). En concreto, el veteadado o GIM visible, influye en la jugosidad, el flavor, la textura, el color, la oxidación

lipídica o la firmeza de la carne (Muchenje *et al.*, 2009; Hocquette *et al.*, 2010). En algunos países, como Estados Unidos o Japón, el veteado es considerado como criterio de evaluación dentro del sistema de clasificación de las canales bovinas o como parámetro diferenciador de la carne fresca de vacuno (Du *et al.*, 2010a). Aunque en Europa el veteado no se considera como criterio específico para la clasificación de las canales, es aceptado que una baja cantidad de GIM puede comprometer la calidad de la carne. Así, un estudio realizado por Savell y Cross (1988) estableció que el porcentaje de GIM en la carne de vacuno para presentar las propiedades organolépticas deseadas por los consumidores se encontraba entre el 3 y el 4%. Sin embargo la selección genética de animales para favorecer el desarrollo muscular, ha conducido a una reducción de la GIM y a un consecuente empeoramiento de la calidad de la carne (Hausman *et al.*, 2009; Tong *et al.*, 2008). Esto ha llevado a que en los últimos años se estén enfocando los esfuerzos en mejorar la proporción de GIM en la carne (Du *et al.*, 2010a) sin que ello suponga un incremento de la grasa acumulada en otros depósitos, como los viscerales y el subcutáneo (SC), ya que esto sería desfavorable tanto desde el punto de vista productivo como comercial (Jeong *et al.*, 2017).

## 2. RAZAS

En España se emplean una gran variedad de razas de vacuno autóctonas para la obtención de carne, como por ejemplo la Asturiana de la Montaña, la Pardo Alpina, la Asturiana de los Valles, la Bruna de los Pirineos, la Pirenaica, la Retinta, la Avileña-Negra Ibérica y la Morucha. Por otro lado, en los rebaños de leche, los terneros y las vacas no productivas de raza Frisona, la más empleada en estos sistemas productivos, también se destinan a este fin. En el presente trabajo se han estudiado dos razas que presentan diferentes aptitudes, características fenotípicas y condiciones generales de manejo: Pirenaica y Frisona, siendo de particular interés el diferente desarrollo del tejido graso en ambas razas, en concreto el intramuscular.

## 2.1. Pirenaica

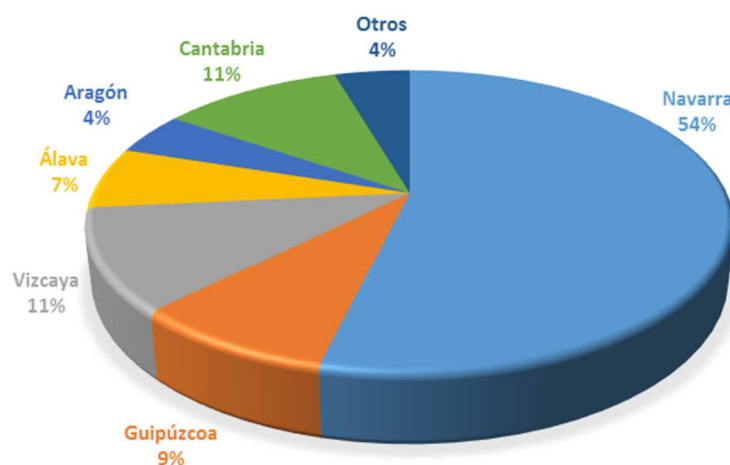
La raza Pirenaica es nativa de la región de Navarra (España) aunque también se cría en Cantabria, el País Vasco, Aragón, Cataluña y, en menor proporción, en pequeños núcleos en Burgos, La Rioja, Soria y Extremadura, según el catálogo oficial de razas de ganado de España. Dentro de la Indicación Geográfica protegida (IGP) “Ternera de Navarra”, es la principal raza bovina, proporcionando actualmente en torno al 90 % de la carne amparada bajo esta denominación mientras que el resto proviene de otras razas como la Pardo Alpina, la Blonda de Aquitania y la Charolesa.

En los últimos 150 años la raza Pirenaica ha sufrido periodos de expansión y de regresión pero hoy en día es una raza protegida que ha estabilizado su número en torno a las 40.000 cabezas (Informe y Memoria de Actividades, CONASPI 2015). Antiguamente era considerada tanto como animal de tiro, como de aptitud lechera o cárnica. Sin embargo, la mecanización de la agricultura y los primeros intentos para la optimización de las razas bovinas nativas que comenzaron a mediados del siglo pasado (Aparicio, 1960; Echeverría, 1975), provocaron que la raza fuese definiéndose hacia la aptitud cárnica como lo es en la actualidad. En 1988 (BOE nº 13 del 16/01/1989), la Confederación Nacional de Asociaciones de Ganado Pirenaica (CONASPI) fue reconocida oficialmente por el MAPAMA como Entidad Colaboradora para la gestión y control del Libro Genealógico y de Comprobación de Rendimientos de la raza bovina Pirenaica. CONASPI incluye varias asociaciones con el propósito común de guardar la “pureza” de la raza. Estas asociaciones se agrupan según la región geográfica en la que actúan: ASPINA (Navarra), HEBE (Guipúzcoa), ASGAPIR (Vizcaya), ARPIEL (Álava), ASAPI (Aragón), ASPIC (Cataluña).

El número de explotaciones ganaderas de vacuno Pirenaico en las distintas comunidades autónomas se encuentra reflejado en la figura 2.1 (Informe y Memoria de Actividades, CONASPI 2015).

El sistema de producción es frecuentemente semiextensivo con aprovechamiento de áreas de pastizal y alimentación a base de pasto, heno, paja de cereal y suplementación en base a pienso concentrado dependiendo de la época del año. Los terneros permanecen con sus madres lactando hasta los cuatro o seis meses de edad. El cebo de

estos terneros se realiza de forma intensiva con pienso concentrado y paja a voluntad hasta que son sacrificados en torno a los 12 ó 14 meses.



**Figura 2.1.** Número de explotaciones de vacuno Pirenaico por comunidades autónomas.

En cuanto a las características de la carne que se obtiene, la raza Pirenaica presenta una baja deposición de GIM, alrededor del 2% en el músculo *longissimus* (Indurain *et al.*, 2010). Esto supone que el contenido de GIM suele ser inferior al considerado como deseable para que la carne presente las propiedades organolépticas deseadas por los consumidores, que, como se ha indicado antes, se encuentra entre el 3 y el 4% (Savell y Cross., 1988).

## 2.2. Frisona

La raza Frisona proviene originalmente de la región de Frisia, zona ubicada en el norte de Holanda y su nombre hace referencia a su origen geográfico, aunque es también conocida como de raza holandesa o vaca Holstein.

A mediados del siglo XIX, se comenzó a importar a España con el propósito de mejorar la producción de leche del país (French, 1968) y desde entonces su presencia ha ido aumentando. En la actualidad estas vacas son las más comunes en las explotaciones de



vacuno lechero, ya que es una raza que destaca por su alta producción de leche y por su buena adaptabilidad.

La Confederación de Asociaciones de Frisona Española (CONAFE), es la entidad de ámbito estatal integrada por las Asociaciones y Federaciones de las Comunidades Autónomas y fundada en 1990 considerada como "Entidad Reconocida Oficial" para la gestión del Libro Genealógico, según orden del MAPAMA. Los objetivos principales de esta asociación tienen como denominador común el desarrollo de programas orientados a la mejora y selección de la raza Frisona. Debido a su amplia distribución a nivel nacional, hay diferentes asociaciones repartidas por la geografía Española dependientes de CONAFE entre las que se encuentran la Asociación Frisona de Navarra (AFNA), la Asociación Frisona Aragonesa (AFRIARA) o la Federación Frisona de Euskadi (EFRIFE).

Según datos al 31 de diciembre de 2016, existen alrededor de 6.000 ganaderías de ganado Frisón en España que explotan aproximadamente 750.000 animales, de los cuales 4.000 son machos y 750.000 hembras (500.000 reproductoras y 250.000 crías) (MAPAMA).

El número de explotaciones ganaderas de vacuno frisón en las distintas provincias se encuentra reflejado en la figura 2.2 (Memoria CONAFE 2015).



**Figura 2.2.** Número de explotaciones de ganado Frisón por provincia.

El sistema de producción más común para esta raza es el intensivo, que aunque requiere de instalaciones más especializadas, permite que los animales se adapten a prácticamente cualquier medio (Blackely, 1985). Los terneros de raza Frisona son destetados durante la primera semana después de tomar calostro. A partir de ese momento, son alimentados con leche artificial y concentrados, hasta los cuatro o seis meses de edad. Después de este tiempo, son alimentados con paja y pienso y cebados hasta que son sacrificados.

En cuanto a la calidad de la carne obtenida de los terneros de raza Frisona, cabe mencionar que en terneros sacrificados alrededor de los 12 meses, se obtienen niveles de infiltración de grasa en el músculo *longissimus* alrededor del 3% (Lizaso *et al.*, 2011).

### 3. TEJIDOS QUE COMPONEN LA CARNE

Los tejidos muscular, conectivo y adiposo integran lo que comúnmente se conoce como carne. El desarrollo de cada uno de estos tejidos y, sobre todo, sus diferentes proporciones, tiene gran importancia e influye tanto en la eficiencia de producción de los animales como en la calidad de los productos afectando a las propiedades organolépticas (terneza, sabor, jugosidad, textura y aroma) de los mismos. Según la especie y raza del animal, su edad y la forma de crianza, así como la función del músculo, la proporción de músculo, tejido conectivo y adiposo es variable (Indurain *et al.*, 2010).

### 4. TEJIDO MUSCULAR

El tejido muscular está constituido por células contráctiles denominadas miocitos que tienen la capacidad de contraerse de forma coordinada en una determinada dirección para producir un movimiento. Esta capacidad de contracción viene dada por la interacción con proteínas contráctiles como la actina y la miosina (Mok y Sweetman, 2011). Debido a que las células musculares son mucho más largas que anchas, a menudo se denominan fibras musculares, aunque una diferencia fundamental de las fibras musculares con las fibras de colágeno, reticulares y elásticas, es que estas últimas no están formadas por células.

Se diferencian tres tipos de tejido muscular atendiendo a sus características morfológicas y funcionales, así como a la disposición de sus células:

- Tejido muscular liso: se trata de un tejido muscular de contracción involuntaria. Puede localizarse en las vísceras y los vasos sanguíneos entre otras localizaciones y sus fibras no presentan estriación transversal en el citoplasma.
- Tejido muscular estriado cardíaco: se trata de un tejido muscular de contracción involuntaria y rítmica. Constituye la musculatura del corazón y sus fibras presentan una estriación transversal en el citoplasma.
- Tejido muscular estriado esquelético: se trata de un tejido muscular de contracción voluntaria. Forma parte del sistema músculo-esquelético y de ciertos órganos como lengua y globo ocular. Sus fibras se caracterizan por presentar una estriación transversal en su citoplasma.

El músculo esquelético está formado por aproximadamente un 75% de agua, un 19% de proteína, de 0,5 a 8% de lípidos y un 1% de glucógeno. Presenta varios tejidos y tipos de células, incluyendo: fibras esqueléticas (miofibras), tejido conectivo, adipocitos intramusculares, tejidos vasculares y nerviosos (Lefaucheur, 2010). En mamíferos, el músculo esquelético comprende aproximadamente el 55% de la masa total del animal. La masa muscular está determinada en gran medida por el número y el tamaño de las fibras musculares que lo componen, las cuales presentan una gran heterogeneidad debido a sus diferentes propiedades, tanto morfológicas (tamaño y color) como fisiológicas (contráctiles y metabólicas). La diversidad presentada por el tejido muscular se debe a las diferencias en la composición y tipo de miofibras presentes en él, y conduce a que las características biológicas que intervienen en la determinación de la calidad de la carne resulten difíciles de identificar (Karlsson *et al.*, 1993; Lefaucheur, 2010).

En especies relativamente maduras al nacer, como es el caso de los bovinos, las miofibras comienzan a diferenciarse en los distintos tipos de fibras durante el desarrollo fetal (Picard *et al.*, 2002). El tipo de fibra está generalmente caracterizado por sus propiedades contráctiles y metabólicas (Lefaucheur, 2010; Astruc, 2014a). Estas propiedades dependen principalmente del tipo de isoforma de la cadena pesada de la miosina (MyHC) presente dentro de los filamentos gruesos. La actividad de la ATPasa está

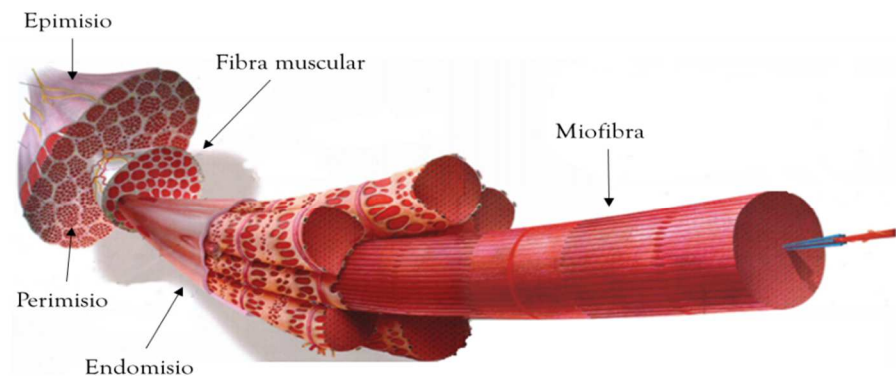
relacionada con la velocidad de contracción de las fibras, y según el tipo mayoritario de MyHC presente en las fibras, éstas se diferencian en lentas (tipo I) y rápidas (tipos IIa, IIx y IIb) (Listrat *et al.*, 2016). En la mayoría de los músculos estriados esqueléticos maduros de mamíferos se expresan los cuatro tipos de MyHC: I, IIa, IIx, y IIb. Aunque inicialmente, se creía que la isoforma MyHC-IIb (la más rápida) no se expresaba en mamíferos de tamaño grande, su expresión ha sido registrada en humanos (Weiss *et al.*, 1999) y vacuno, especie en la que se ha detectado en los músculos *semitendinosus* y *longissimus thoracis* de razas de aptitud cárnica como la Blonde de Aquitania (Picard y Cassar-Malek, 2009)

Además de por sus propiedades contráctiles, las fibras se pueden diferenciar por la vía metabólica utilizada para la generación de ATP en el músculo. Las fibras que utilizan la vía oxidativa mediante la cual el piruvato es oxidado en las mitocondrias, son aeróbicas, de contracción lenta (tipo I), de color rojo y ricas en mioglobina. Sin embargo, las fibras que utilizan la vía glicolítica, en la que el piruvato se convierte en ácido láctico en el sarcómero, son fibras anaeróbicas, de contracción rápida (tipo IIa, IIx, y IIb), de color blanco y casi carentes de mioglobina debido a los bajos requerimientos de oxígeno. Una fibra puede contener un solo tipo de MyHC o varios (Pette y Starron, 2000) de forma que las fibras musculares pueden ser lentas-oxidativas, rápidas-oxidativas-glicolíticas, o rápidas-glicolíticas (Oury *et al.*, 2010).

La composición de las fibras musculares está influenciada por la especie, la raza, el sexo, la edad del animal, su actividad física, la temperatura ambiental y la alimentación (Listrat *et al.*, 2016). Diferentes estudios han determinado que, en vacuno, para un mismo animal el tipo de fibra varía según el tipo de músculo, la localización en el cuerpo del animal y su funcionalidad dentro de éste (Devine *et al.*, 1984; Totland *et al.*, 1991; Robelin *et al.*, 1993; Picard *et al.*, 1996; Hwang *et al.*, 2010; Listrat *et al.*, 2016). Para un mismo músculo, se ha demostrado que la composición de miofibras también varía según la especie. Así, en porcino, el músculo *longissimus* contiene aproximadamente un 10% de fibras de tipo I, 10% IIa, 25% IIx y 55% IIb, mientras que el mismo músculo en bovino contiene un promedio de 30% de fibras tipo I, 18% IIa y 52% IIx (Listrat *et al.*, 2016). Estas diferencias adquieren especial importancia en animales de granja en los que

las mencionadas características de las fibras musculares juegan un papel clave en la determinación de la calidad de la carne (Picard *et al.*, 2002).

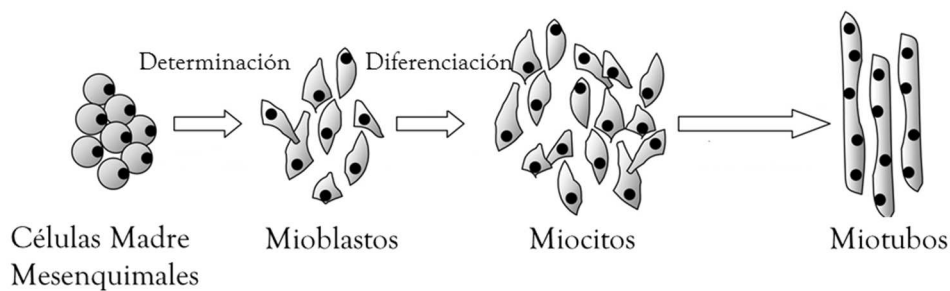
En el músculo esquelético, las fibras musculares individuales están rodeadas, y se mantienen juntas, por varias capas diferentes de tejido conectivo denominadas epimisio (la envoltura externa del músculo), perimisio, (que compartimenta los haces de fibras) y endomisio, (que rodea cada fibra muscular) (Listrat *et al.*, 2016) (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Organización general del músculo. Adaptado de Listrat *et al.*, (2016)

#### 4.1. Miogénesis

La miogénesis es el proceso de determinación y formación de las células del músculo (Bonnet *et al.*, 2010). La diferenciación de las células musculares comienza durante el desarrollo embrionario. Está mediada por determinadas señales moleculares provenientes de los tejidos adyacentes que inducen a la determinación de una parte de las células madre mesenquimales (CMM) hacia el linaje miogénico y a su diferenciación en mioblastos (Buckingham, 2001). Posteriormente estos mioblastos proliferan y se fusionan formando los denominados miotubos (Figura 2.4), proceso que se ve acompañado por un incremento en la expresión de genes clave para la funcionalidad y desarrollo del músculo (Lodish *et al.*, 2008). Más adelante, los miotubos maduros darán lugar a las fibras musculares especializadas o miofibras (Brand-Saberi, 2005).

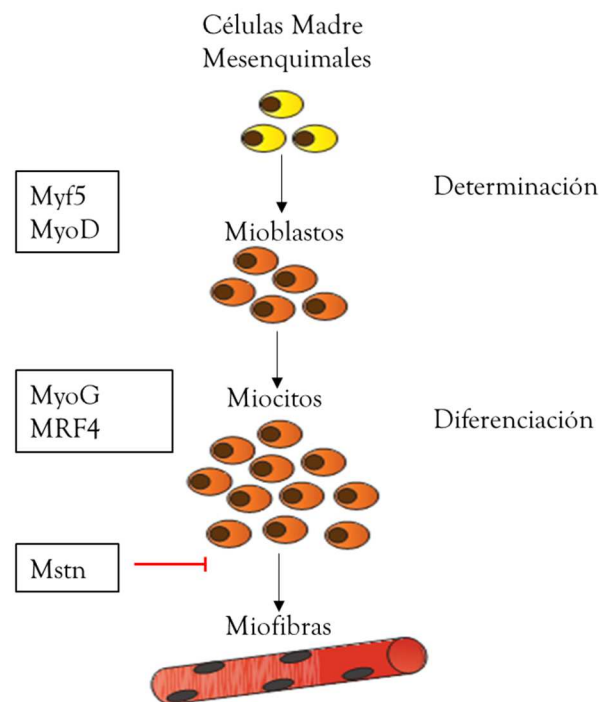


**Figura 2.4.** Proceso de diferenciación de células madre mesenquimales en miotubos. Adaptado de Rios *et al.*, (2002)

A nivel celular, el proceso de crecimiento muscular puede definirse como un aumento combinado del número de miofibras (hiperplasia) y de su diámetro y longitud (hipertrofia). Durante el desarrollo fetal, el crecimiento muscular se produce principalmente por medio de la hiperplasia. Diferentes estudios han demostrado que, en bovino, el número total de miofibras se fija al final del segundo trimestre de gestación y que partir de ese momento, el tamaño de miofibras aumenta por hipertrofia (Picard *et al.*, 2002). Este proceso de hipertrofia continúa durante los períodos perinatal y postnatal (Brandstetter *et al.*, 1998; Du *et al.*, 2013) e implica la fusión de células satélites, o células progenitoras del músculo esquelético que residen entre la lámina basal y las membranas plasmáticas de las fibras esqueléticas, con las miofibras existentes (Biressi *et al.*, 2007).

#### 4.1.1. Principales reguladores de la miogénesis

La diferenciación miogénica está regulada y controlada por la actividad de distintos factores de transcripción, como los factores de regulación miogénica (MRFs) (Sartorelli y Caretti, 2005) y citoquinas como la miostatina (McPherron y Lee., 1997). En la figura 2.5 están representados algunos de los diferentes factores que intervienen en los principales procesos de la miogénesis.

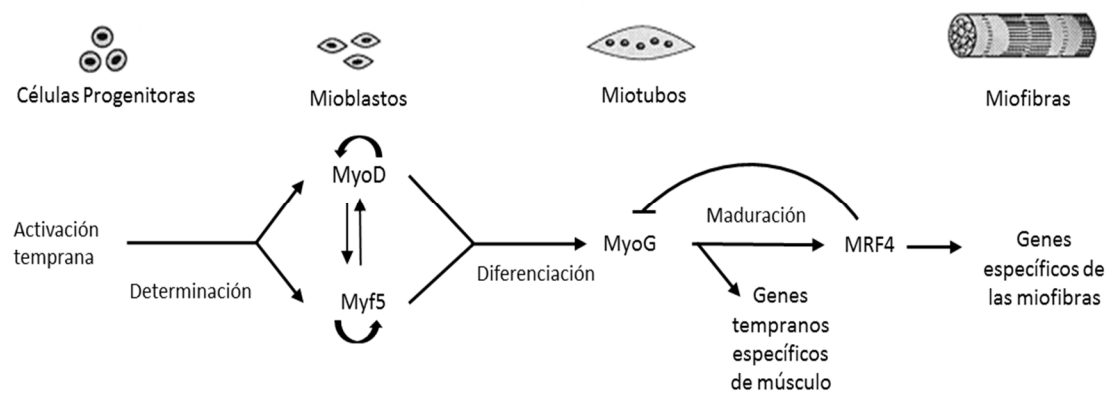


**Figura 2.5.** Principales factores que influyen en la determinación y diferenciación de las células madre mesenquimales en miocitos. Adaptado de Rios *et al.* (2002) y Apponi *et al.* (2011).

Los factores de regulación miogénica (MRFs) son los factores de transcripción que controlan la determinación y diferenciación de las células del músculo esquelético (Megeny y Rudnicki, 1995; Mok y Sweetman, 2011; Moncaut *et al.*, 2013). A diferencia de otros factores de transcripción involucrados en la miogénesis, los MRFs, se expresan específicamente en el músculo esquelético (Brand-Saberi, 2005).

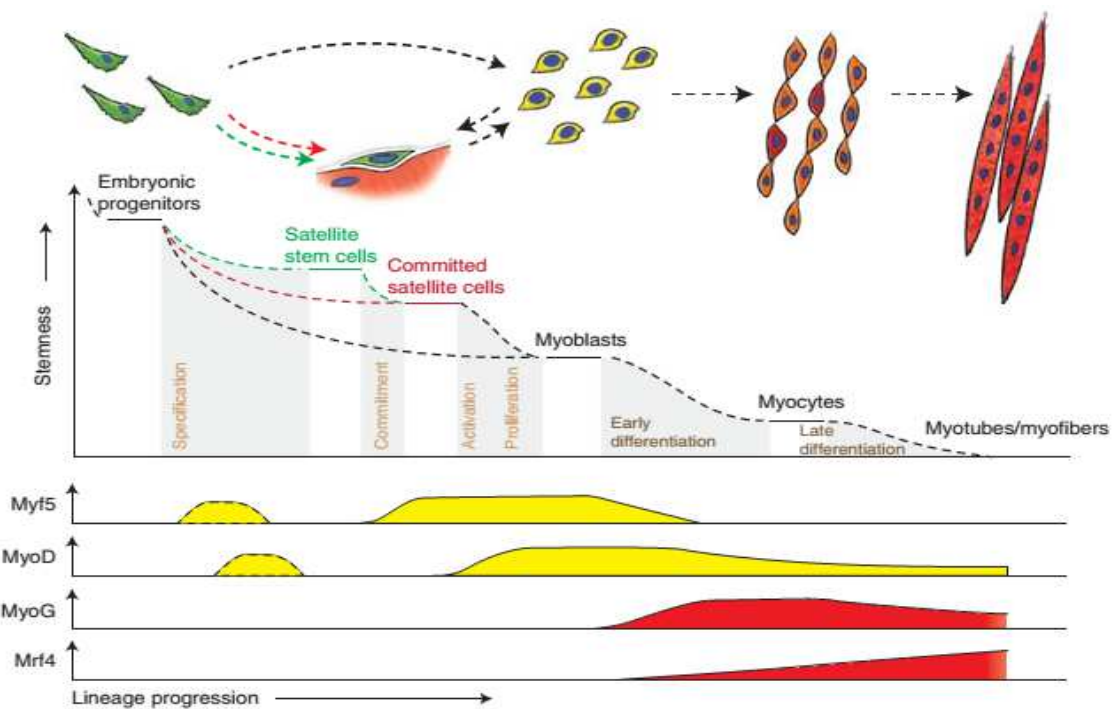
Los MRFs identificados incluyen el factor miogénico 5 (*Myf5*), el gen que codifica para la proteína 1 de diferenciación miogénica (*MyoD*), la miogenina (*MyoG*) y el factor de regulación miogénica 4 (*MRF4*) (Stewart y Rittweger, 2006) (Figura 2.6).

Son los reguladores centrales implicados en la diferenciación y determinación de los mioblastos (Francetic y Li, 2011). Aunque los diferentes factores mantienen una cierta redundancia funcional, cada uno de ellos presenta determinadas funciones específicas en el proceso de la miogénesis (Mok y Sweetman, 2011), lo que posiblemente sea debido a que los cuatro MRFs descritos parecen haber evolucionado a partir de un único gen ancestral común (Singh y Dilworth, 2013).



**Figura 2.6.** Algunos de los principales factores implicados en el proceso de diferenciación de los miotubos y diferenciación de los miofibras. Adaptado de Olson y Klein (1994)

Estos factores se expresan de una forma coordinada y jerárquica y generalmente, el primer factor que se expresa es *Myf5*, seguido de *MyoD*, *MyoG*, y *MRF4*, como muestra la Figura 2.7.



**Figura 2.7.** Expresión de los factores de regulación miogénica a lo largo de la diferenciación del tejido muscular. Adaptado de Bentzinger *et al.* (2012).



#### 4.1.1.1. *Myf5* y *MyoD*

*Myf5* y *MyoD* son considerados como los marcadores más tempranos de diferenciación miogénica (Francetic y Li, 2011) y forman parte de la determinación temprana del músculo esquelético (Tajbakhsh y Buckingham, 2000). La interrupción de estos dos genes se traduce en una ausencia de mioblastos o miofibras (Berkes y Tapscott, 2005). La diferencia entre ellos es que *Myf5* parece actuar en la parte superior de la cascada de expresión miogénica, por lo que su activación no depende de la expresión de otros genes (Mok y Sweetman, 2011), mientras que se ha visto que *MyoD* tiene un papel importante también en la diferenciación terminal de la miogénesis (Francetic y Li, 2011).

#### 4.1.1.2. Miogenina

La miogenina es una proteína que está codificada por el gen *MyoG*. Así como *Myf5* y *MyoD* son considerados factores tempranos o de determinación del linaje miogénico, *MyoG* es un factor de diferenciación terminal de las miofibras debido que, en su ausencia, el tejido muscular se desarrolla de forma típica hasta llegar a la etapa de formación de los mioblastos (Berkes y Tapscott, 2005; Singh y Dilworth, 2013). De esta forma, actúa *a posteriori* (Singh y Dilworth, 2013), siendo necesaria para la expresión del fenotipo muscular terminal establecido anteriormente por *MyoD* y *Myf5* y participa en la formación de los miotubos polinucleados (Berkes y Tapscott, 2005).

#### 4.1.1.3. *MRF4*

Al final de la formación del músculo esquelético, la expresión de *MRF4* conduce a la formación de fibras musculares maduras (Keren *et al.*, 2006; Kollias y McDermott, 2008). Controla la expresión del gen *MyoG*, regulándolo de forma negativa, y se expresa predominantemente en el músculo esquelético adulto (Zhang *et al.*, 1995).

#### 4.1.1.4. Miostatina

La miostatina pertenece al grupo de proteínas de bajo peso molecular esenciales en procesos de comunicación intercelular denominadas citoquinas, que son producidas por varios tipos celulares e intervienen en procesos como la proliferación, diferenciación, movimiento, supervivencia y muerte celular. Según la célula que las produzca, las citoquinas se denominan linfoquinas (linfocito), monoquinas (monocitos,

precursores de los macrófagos), adipoquinas (células adiposas o adipocitos), mioquinas (células musculares o miocitos) o interleuquinas (células hematopoyéticas). Los mecanismos implicados en la interacción entre adipocitos intramusculares y miocitos durante el desarrollo de la GIM están probablemente relacionados con la secreción de adipoquinas por parte de los adipocitos (Kokta *et al.*, 2004) y mioquinas por parte de miocitos (Hirai *et al.*, 2007) por lo que estas dos “familias” de citoquinas son las que resultan de más interés en este estudio.

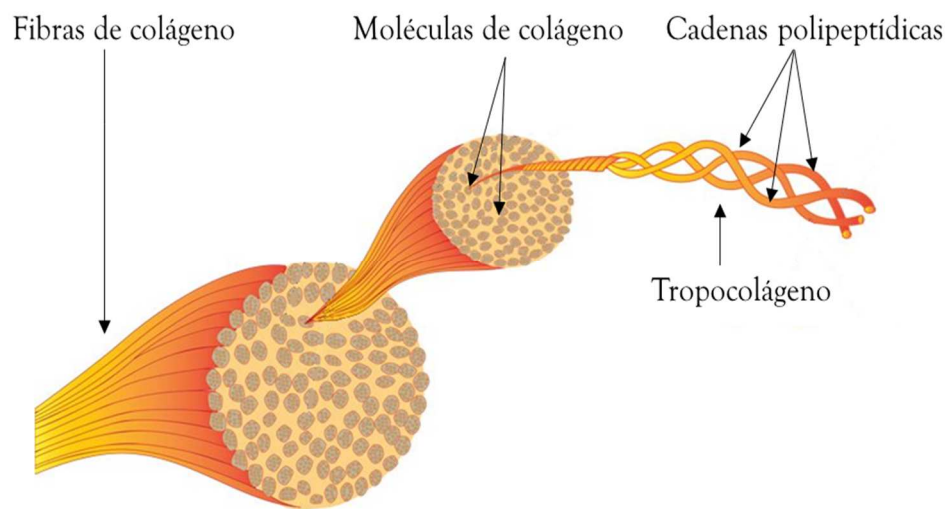
La miostatina es una proteína altamente conservada secretada por los miocitos, por lo que se considera una mioquina. El gen que la codifica, (*Mstn*), actúa como un potente regulador del desarrollo del músculo esquelético, donde se expresa de forma abundante, actuando como un regulador negativo del crecimiento muscular (McPherron y Lee, 1997; Lee y McPherron, 2001; Guo *et al.*, 2009). Su importancia e implicación en el desarrollo miogénico ha quedado ampliamente demostrada mediante diferentes estudios realizados en ratones (McPherron y Lee, 1997), rumiantes y humanos (Rodgers y Garikipati, 2008) en los cuales se observó que bloqueando el gen *Mstn* se origina la hipertrofia del músculo esquelético. También hay estudios en los que se ha visto que esta mioquina puede actuar como regulador de la composición del tipo de fibra muscular a través de la regulación negativa de *MyoD* bloqueando la formación de fibras de tipo rápido-glicolíticas a través de las vías de señalización de *MEF2* y *MyoD* (Hennebry *et al.*, 2009).

## 5. TEJIDO CONECTIVO

El tejido conectivo da soporte al músculo además de conducir el abastecimiento tanto vascular como nervioso hacia y desde el músculo (Kopp, 1971). Está constituido por fibroblastos provenientes de células madre mesenquimales (CMM) que se han diferenciado hacia el linaje fibrogénico, las fibras de colágeno sintetizadas por estos fibroblastos y una sustancia fundamentalmente amorfa llamada matriz extracelular (MEC). Ésta MEC está constituida principalmente por mucopolisacáridos (glicosaminoglicanos y proteoglicanos), adipocitos, carbohidratos y agua (Dutson, 1974). Los mucopolisacáridos actúan principalmente como matriz celular, barrera protectora

contra agentes invasores, lubricante y retienen agua e iones. Además son esenciales para el mantenimiento de la integridad estructural de muchos tejidos conectivos (Merkel, 1994) por lo que la forma en la que interactúan con el colágeno puede ser importante en la estructura final del tejido conectivo (Dutson, 1974).

El colágeno es el componente principal del tejido conectivo muscular. Independientemente del tipo, la unidad estructural básica del colágeno (tropocolágeno) es una estructura helicoidal que consiste en tres cadenas polipeptídicas enrolladas entre sí para formar una espiral (Figura 2.8).



**Figura 2.8.** Estructura general de las fibras de colágeno.

En función de su composición en aminoácidos y su secuencia se distinguen distintos tipos de colágeno (I, II, III, IV y V), aunque en el músculo de mamíferos los tipos de colágeno I y III son los mayoritarios (Bailey y Light, 1989). La proporción de colágeno intramuscular depende del tipo de músculo, de la especie, del genotipo, de la edad, del sexo y del nivel de ejercicio físico (Purslow, 2005) llegando a poder ser hasta tres veces mayor en distintos músculos (Heinze *et al.*, 1986). Se ha visto que la textura de la carne está más influenciada por la composición o tipo del colágeno presente en el músculo que por su cantidad (Bailey y Light, 1989). Por su composición y estructura, el tejido conectivo influye en la ternura de la carne (Astruc, 2014b) por lo que el colágeno es generalmente considerado como el principal determinante de la dureza de la carne

(Listrat *et al.*, 2016). En ganado bovino adulto, el contenido total de colágeno total varía de 1 a 15% del peso seco muscular (Purslow, 2005) y aunque la concentración de colágeno no cambia significativamente desde el nacimiento del animal hasta el sacrificio, durante el crecimiento y con el incremento de la edad, se producen cambios en su estructura debidos a un aumento del número de enlaces covalentes entre las moléculas que lo componen. Esto se asocia a una menor solubilidad del colágeno (Kopp, 1976), lo que conlleva una menor ternura de la carne (Hall y Hunt, 1982).

La fuerza de corte o dureza de la carne cruda está altamente correlacionada con su contenido de colágeno (Lepetit, 2008; Nishimura, 2015). En el caso de la carne cocinada, durante el calentamiento, las fibras de colágeno se contraen y presurizan las fibras musculares con una magnitud que depende del grado de reticulación del colágeno y de la organización del endomisio y del perimisio (Listrat *et al.*, 2016). El nivel de interacción entre el colágeno y las fibras musculares modula la desnaturalización térmica del colágeno y por lo tanto el desarrollo de la ternura de la carne durante la cocción (Lepetit, 2008).

### **5.1. Fibrogénesis**

La fibrogénesis consiste en la generación de fibroblastos y fibras del tejido conectivo. Los fibroblastos son células activas y de gran producción y secreción que sintetizan el colágeno y los glicosaminoglucanos de la MEC. Estas células son morfológicamente heterogéneas, con diversas apariencias dependiendo de su localización y actividad. Cuando disminuye su actividad secretora se les denomina fibrocitos, que son células fusiformes con pocas prolongaciones, un núcleo celular pequeño y alargado y que han perdido la capacidad de dividirse pero que tienen la capacidad de volver a diferenciarse en fibroblastos.

En la fibrogénesis intervienen numerosas citoquinas y factores de crecimiento como los descritos a continuación.

### 5.1.1. Principales reguladores de la fibrogénesis

#### 5.1.1.1. *FN1*

En gen *FN1* codifica la fibronectina, una glicoproteína presente en la MEC implicada en la adhesión y movilidad celular y en el mantenimiento de la forma celular, siendo necesaria para el ensamblaje final de las fibras de colágeno (Kadler *et al.*, 2008; Hernández-Gea y Friedman, 2011). Estudios como el llevado a cabo por Kennedy *et al.*, (2008) han demostrado que la adhesión de fibroblastos a la proteína fibronectina desencadena la expresión de genes fibrogénicos como el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), procolágeno tipo XIX alfa 1 (*Col19a1*) y procolágeno tipo I alfa 2 (*Col1a2*).

#### 5.1.1.2. *FGF2*

El factor de crecimiento 2 de los fibroblastos (*FGF2*) es miembro de una familia de proteínas estructuralmente relacionadas que afectan al crecimiento, la diferenciación, la migración y la supervivencia de una amplia variedad de tipos celulares (Bikfalvi *et al.*, 1997). Al igual que otros miembros de la familia de factores de crecimiento de los fibroblastos (FGF), una heparina y heparán sulfato (glicosaminoglicanos), lo que refleja un complejo mecanismo de regulación bioquímica (Nugent y Iozzo, 2000). *FGF2* interactúa con los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos situados en la superficie celular codificados por los genes *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* y *FGFR4* y la formación del dímero ligando-receptor se traduce en la activación de los dominios de la proteína del tipo tirosin-kinasa.

Una de las actividades mejor caracterizadas de *FGF2* es su capacidad para regular la vascularización (angiogénesis) en células musculares (Nugent y Iozzo, 2000). Algunos autores han demostrado la relación de este factor de crecimiento con la diferenciación de las CMM en adipocitos o incluso en osteocitos (células formadoras del hueso) según el contexto celular en el que sea expresado este factor (Hutley *et al.* 2004; Neubauer *et al.*, 2004).

### 5.1.1.3. *TGFB*

La fibrogénesis y síntesis de colágeno están principalmente mediadas por la vía de señalización del factor de crecimiento transformante (*TGFB*) (Goselin *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005, Salvadori *et al.*, 2005), que induce la expresión de genes fibrogénicos, incluyendo *FN1* y el gen codificante para la formación colágeno tipo I (Kennedy *et al.*, 2008). Además, disminuye la actividad de las proteasas de la matriz extracelular, lo que resulta en una disminución de la degradación del colágeno (Du *et al.*, 2013). La isoforma *TGFB1* en concreto, se expresa principalmente en células endoteliales, fibroblastos, células hematopoyéticas y células del músculo liso (Ghosh *et al.*, 2005).

## 6. TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo está ampliamente distribuido por todo el organismo y comprende entre el 5% y el 35% de la masa del animal, dependiendo de la edad del animal, el genotipo y de su alimentación (Bonnet *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2011). Está compuesto principalmente por células especializadas en la acumulación de lípidos denominadas adipocitos. Su principal función es el almacenamiento de energía en forma de triglicéridos en periodos de alta ingesta energética para movilizarla de nuevo al organismo a través de la lipólisis cuando se produce un déficit calórico (González *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2014). Además de su función energética, el tejido adiposo es un órgano endocrino que produce una alta variedad de hormonas y citoquinas (leptina, adiponectina, etc.), que regulan el metabolismo, influyen en la composición corporal e intervienen en la comunicación con otros órganos.

Existen dos tipos de tejido adiposo: el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo marrón o pardo. Aparte de su diferencia de coloración, estos dos tejidos también se diferencian en cuanto a morfología, distribución, expresión génica y función (Bonnet *et al.*, 2010). A pesar de que durante muchos años se ha considerado únicamente la existencia de los tejidos adiposos blanco y marrón, más recientemente esto se ha puesto en duda debido al descubrimiento de la existencia de un tercer tipo de adipocitos llamados “beige/brite”, en ratones, humanos (Harms y Seale, 2013), en ganado bovino (Asano *et al.*, 2013) y

ovino (Pope *et al.*, 2014), que se desarrollan en el tejido adiposo blanco como respuesta a determinadas hormonas y al frío.

En cuanto al denominado tejido adiposo marrón, está compuesto por adipocitos de pequeño tamaño (con un diámetro de alrededor de 25-40  $\mu\text{m}$ ) y multiloculares, es decir, que presentan varias gotas lipídicas rodeadas de un gran número de mitocondrias (Bonnet *et al.*, 2010). Sus principales funciones son la generación de calor o termogénesis y la homeostasis térmica (Rosen y Spiegelman, 2006). En la mayoría de las especies, este tipo de tejido adiposo es característico de animales recién nacidos y en mamíferos adultos de los animales que hibernan (Rosen y MacDougald, 2006).

El tejido adiposo blanco se distribuye en el cuerpo en diferentes depósitos. Está constituido por adipocitos maduros, preadipocitos, fibroblastos, células vasculares del músculo liso, células endoteliales, monocitos residentes macrófagos y linfocitos (Trujillo y Scherer, 2006; Schäffler y Büchler, 2007) Además de las ya mencionadas funciones (reservorio de energía y endocrina) el tejido adiposo blanco presenta un papel estructural debido a que actúa como soporte mecánico y como protección en determinadas partes del organismo (Kershaw y Flier, 2004; Vigouroux *et al.*, 2011; Louveau *et al.*, 2016). Al contrario que en el tejido adiposo marrón, los adipocitos que forman el tejido adiposo blanco son en general de tamaño grande, pudiendo alcanzar hasta 100-200  $\mu\text{m}$  dependiendo de la especie de animal, su sexo y la localización de tejido adiposo (Vézinhet, 1976). Además, el citoplasma de los adipocitos del tejido adiposo blanco está ocupado casi en su totalidad por una única vesícula de grasa y presentan un número reducido de mitocondrias (Lawrence y Fowler, 2002). Es el tipo de tejido adiposo predominante en animales adultos y en animales destinados a la producción de carne presenta una demostrada influencia sobre la calidad de la misma.

En todos los mamíferos, el tejido adiposo se localiza en depósitos específicos que varían su proporción y composición en función de la especie, la edad, el sexo y el régimen alimenticio entre otros factores, (Kempster, 1981). Los depósitos principales presentes en los animales son: el depósito visceral, que comprende la grasa pélvico-renal que recubre los riñones y cavidad pélvica, la grasa mesentérica, que se localiza alrededor del intestino y la grasa omental, que recubre los preestómagos, el depósito SC, que recubre

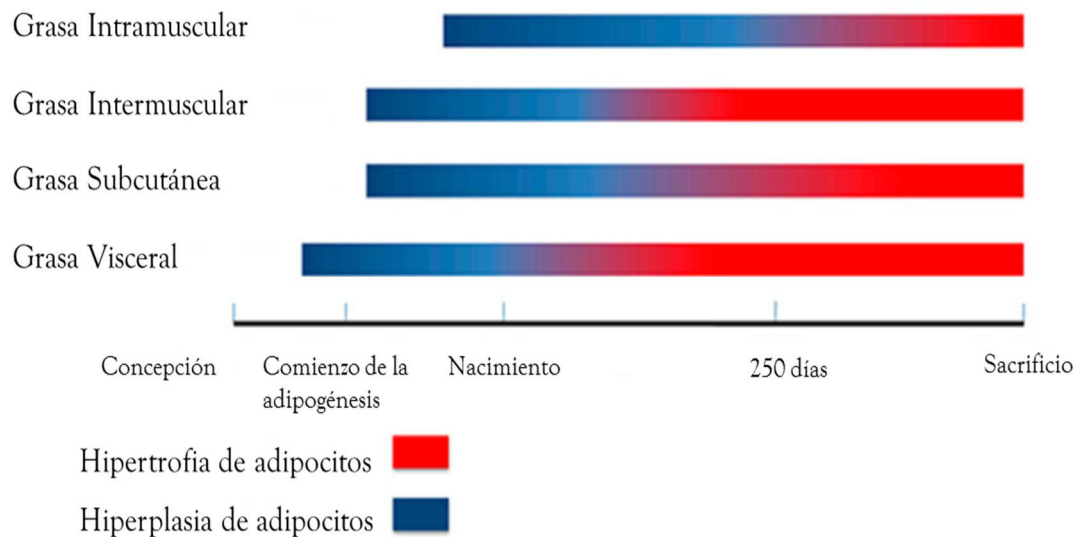
la parte externa de la canal, el depósito intermuscular localizado entre los músculos, y el depósito intramuscular (IM), que es la grasa infiltrada en los músculos (Robelin, 1986; Du *et al.*, 2013). La variación que se produce en la distribución del tejido adiposo entre depósitos de los animales de granja tiene importantes implicaciones económicas debido a su influencia en la eficiencia de producción y la calidad de los productos (Allen, 1969; Du *et al.*, 2013).

La deposición de tejido adiposo se atribuye a un aumento del número de adipocitos (hiperplasia), un aumento del volumen de adipocitos (hipertrofia) o a una combinación de ambos (Hood y Allen 1973; Cianzio *et al.*, 1982; Jo *et al.*, 2009). La intensidad de ambos procesos está influenciada por factores tales como el genotipo, el sexo, la edad, el régimen de alimentación y el depósito de tejido adiposo individual (Hood y Allen 1973, Cianzio *et al.*, 1982, Vernon, 1986). Aunque hay estudios que apuntan a que el crecimiento mediado por hiperplasia aparece sólo en las primeras etapas en el desarrollo de tejido adiposo (Drolet *et al.*, 2008; Spalding *et al.*, 2008), otros autores como May *et al.* (1994) y Schoonmaker *et al.* (2001) han demostrado que en el depósito intramuscular de ganado bovino continúa la hiperplasia, además de hipertrofia, en animales adultos.

En los animales de la especie bovina, la deposición de grasa no se realiza de manera simultánea en los diferentes depósitos (Figura 2.9). La hiperplasia en el depósito visceral de estos animales se produce durante el periodo fetal hasta la etapa postnatal temprana (Robelin, 1981) mientras que la formación de adipocitos subcutáneos se produce ligeramente más tarde (Hood y Allen, 1973). Los adipocitos en la grasa intermuscular son detectables hacia los 180 d de gestación (Taga *et al.*, 2011) y se estima que la formación de los adipocitos intramusculares ocurre principalmente durante la etapa fetal-neonatal tardía, correspondiendo aproximadamente a 250 días de edad. Por lo tanto, desde el punto de vista del desarrollo, el intramuscular es el último depósito graso en formarse en esta especie (Hocquette *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2013). En estudios realizados en vacuno, se ha identificado el periodo entre el destete temprano (alrededor de los 73 días) (Wertz *et al.*, 2001) y los 250 días de edad como la "*marbling window*" (Du *et al.*, 2013) debido a que, durante este periodo, la suplementación con nutrientes u otros compuestos bioactivos para mejorar la deposición de grasa puede incentivar específicamente la formación de ésta en el depósito IM frente a otros depósitos menos



relacionados con la calidad de la carne (Wertz *et al.*, 2001, Wertz *et al.*, 2002, Pyatt *et al.* 2005a, b; Corah y McCully, 2007, Jeong *et al.*, 2017).



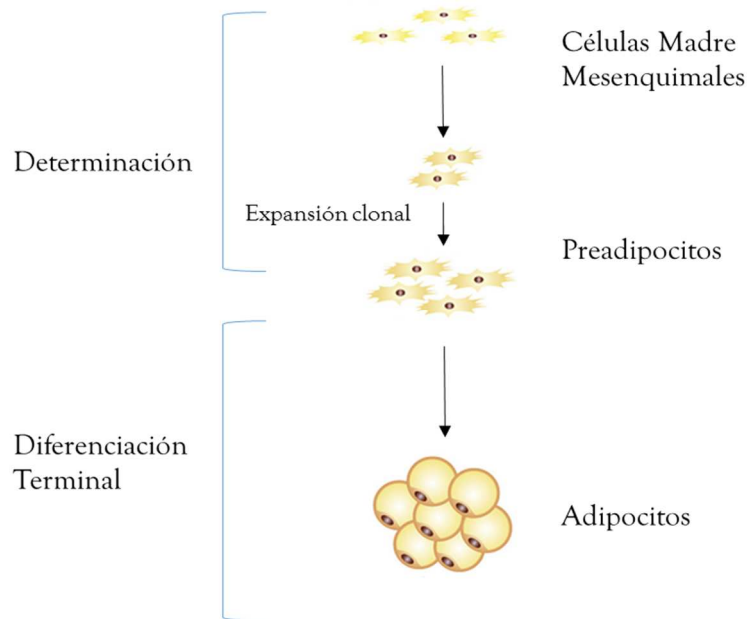
**Figura 2.9.** Formación de adipocitos en los cuatro principales depósitos adiposos en bovino. Adaptado de Du *et al.*, (2013).

### 6.1. Adipogénesis

Se conoce como adipogénesis el proceso de proliferación, diferenciación y conversión de las células en adipocitos (Hausman *et al.*, 2014). Los adipocitos no tienen capacidad de división, sino que proceden de células precursoras de tipo fibroblasto y origen mesodérmico (CMM), las cuales proliferan, se diferencian y dan origen a células adiposas maduras (Flint y Vernon, 1993; Hausman *et al.*, 2001; Kokta *et al.*, 2004).

En la adipogénesis se distinguen dos fases: determinación y diferenciación terminal (Figura 2.10) (MacDougald y Mandrup, 2002). La primera fase da lugar a la conversión de las CMM en preadipocitos, los que morfológicamente no se pueden distinguir de su célula precursora pero han perdido el potencial de diferenciarse en otros tipos celulares. (Moreno-Navarrete y Fernández-Real, 2012). En la segunda fase, los preadipocitos adquieren la capacidad celular necesaria para el transporte y síntesis de lípidos y la secreción de adipoquinas, así como sensibilidad a la insulina, convirtiéndose en

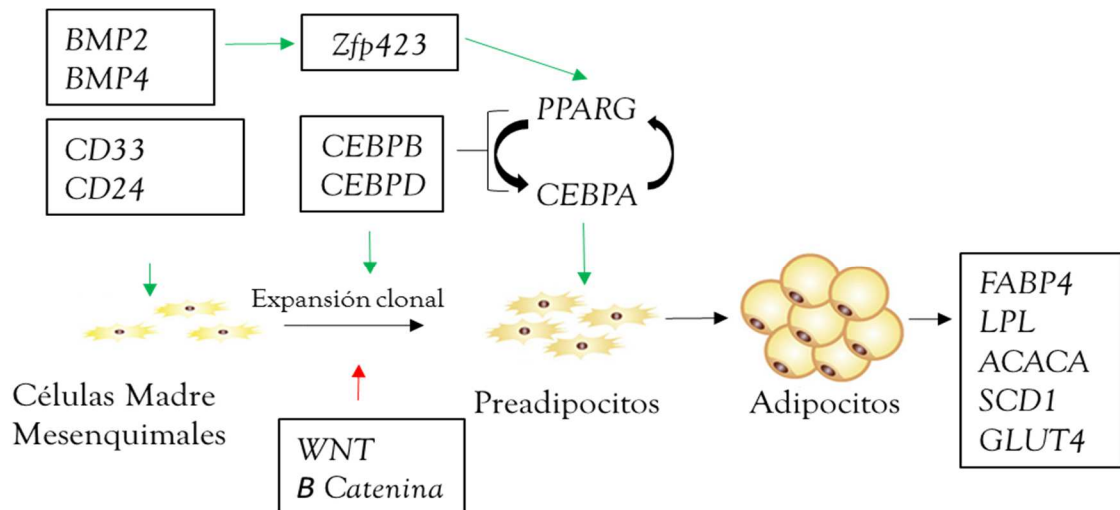
adipocitos maduros (Lefterova y Lazar, 2009; Rosen y MacDougald, 2006). En algunos modelos de preadipocitos (tales como las líneas celulares de ratón 3T3-L1, 3T3-F442A) se ha observado que es necesario para la diferenciación y realizar una o dos rondas de división celular, denominadas fase de expansión clonal. Se cree que esta división celular es necesaria para desenrollar el ADN, permitiendo que los factores de transcripción accedan a los elementos reguladores de respuesta presentes en los genes implicados en la diferenciación de los adipocitos (Cornelius *et al.*, 1994). También se ha observado sin embargo, que en algunos modelos celulares (como C3H10T1/2 de ratón y preadipocitos humanos) la diferenciación puede ocurrir sin necesidad de esta división. Una vez finalizada la fase de expansión clonal, la diferenciación continúa mediante la expresión de los genes adipogénicos.



**Figura 2.10.** Fases principales del proceso de diferenciación del adipocito. Adaptado de Christodoulides *et al.*, (2008).

La diferenciación requiere la activación de numerosos factores de transcripción que son los responsables de la inducción e inhibición coordinados de más de 2.000 genes relacionados con la regulación de la morfología y la fisiología de los adipocitos (Farmer, 2006). Aunque se desconoce el factor concreto o el gen responsable de que se inicie la conversión de CMM en adipocitos, se cree que los factores que inician este proceso son

secretados por células que se encuentran dentro de la fracción estromo-vascular y/o por adipocitos maduros sometidos a hipertrofia (Lau *et al.*, 1990; Marques *et al.*, 1998; Otto y Lane, 2005).



**Figura 2.11.** Algunos de los principales factores involucrados en el proceso de diferenciación de los adipocitos.

En la Figura 2.11 se destacan los principales genes relacionados con la regulación de la formación de adipocitos. Se ha demostrado que las proteínas morfogénicas óseas 2 y 4 (*BMP2* y *BMP4*) juegan un papel importante en el control de la determinación *ex vivo* (Ahrens *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993) al ser responsables de que células 10T1/2 (la línea de células madre multipotentes más comúnmente utilizada) adquieran las características propias de preadipocitos (Butterwith *et al.*, 1996, Tang *et al.*, 2004). En un estudio realizado por Gupta *et al.* (2010) se propuso un modelo para la regulación transcripcional de la adipogénesis en el cual *BMP2* y *BMP4* regulaban la expresión del gen *zinc finger protein 423* (*Zfp423*), que a su vez regulaba la expresión del gen receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (*PPARG*) en preadipocitos que a su vez regula el gen codificante para la proteína de unión a la secuencia CCAAT alfa (*CEBPA*). También se ha identificado una serie de marcadores de superficie celular (*CD34*, *CD24*) como responsables de la diferenciación de CMM en adipocitos que son capaces de formar depósitos adiposos funcionales *in vivo* (Rodeheffer *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2008). De igual manera, se ha visto que la supresión de la expresión de genes como los

pertenecientes a la cascada de señalización *WNT/B-Catenina* es esencial para la diferenciación de las CMM en adipocitos (Christodoulides *et al.*, 2008) debido a su papel en el bloqueo la adipogénesis.

La expansión clonal está mediada por gen codificante para la proteína de unión a la secuencia CCAAT beta y delta (*CEBPB* y *CEBPD*) (Tang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004) y la diferenciación terminal es principalmente regulada a través de la expresión de los genes *PPARG* y *CEBPA*. Estos dos genes actúan sinérgicamente para activar la transcripción de genes que producen el fenotipo del adipocito (Tontonoz *et al.*, 1994b). El *PPARG* tiene un importante papel en el proceso de diferenciación, siendo primordial para el mantenimiento del estado diferenciado de los adipocitos (Nakamura *et al.*, 2014). Mientras que el gen *PPARG* es suficiente para inducir la expresión de diversos genes relacionados con el metabolismo lipídico, *CEBPA* es indispensable para conferir al adipocito sensibilidad a la insulina (Wu *et al.*, 1999). Por último, tanto *PPARG* como *CEBPA* influyen en la activación del conjunto de genes expresados por los adipocitos que incluyen: la proteína de unión a ácidos grasos (*FABP4*), la lipoproteína lipasa (LPL), la carboxilasa de acetyl-CoA (*ACACA*), la desaturasa de estearoil-CoA (*SCD*) y el transportador de glucosa tipo 4 (*GLUT4*), entre otros (Gregoire *et al.*, 1998), lo que va acompañado de la acumulación de grasa por parte de los adipocitos confiriéndoles una forma más globular (Lefterova *et al.*, 2008).

### 6.1.1. Principales reguladores de la adipogénesis: Factores de transcripción

#### 6.1.1.1. *PPARs*

Los PPAR son miembros de la familia de receptores de hormonas nucleares que incluye receptores de ácido retinoico, receptores de hormonas tiroideas y receptores de vitamina D (Aranda y Pascual, 2001) y está constituida por *PPARA*, *PPARD* y *PPARG*.

El *PPARA* controla la expresión de los genes que codifican enzimas mitocondriales del catabolismo de ácidos grasos y  $\beta$ -oxidación mitocondrial y peroxisomal (Aoyama *et al.*, 1998). También controla la expresión de los genes involucrados en la síntesis y transporte de colesterol (Schoonjans *et al.*, 1996) además de estar implicado en el metabolismo de las lipoproteínas (Tyagi *et al.*, 2011). *PPARD* influye positivamente en

el catabolismo de los lípidos y la liberación de la energía en el tejido adiposo intramuscular (Barish *et al.*, 2006; Tyagi *et al.*, 2011). Por último, *PPARG* existe como tres isoformas, designadas *PPARG1*, *PPARG2* y *PPARG3*, que se transcriben a partir del mismo factor de transcripción (*PPARG*) a través de *splicing* alternativo (Zhu *et al.*, 1995) siendo *PPARG2* la isoforma que está presente de forma específica en los adipocitos (Tontonoz *et al.*, 1994b; Braissant *et al.*, 1996; Fajas *et al.*, 1998) y que interviene en la diferenciación de los mismos (Ren *et al.*, 2002). *PPARG* se induce durante la diferenciación y es responsable de activar una serie de genes implicados en la fijación, absorción y almacenamiento de ácidos grasos, incluyendo *FABP4* (Tontonoz *et al.*, 1994a), *LPL*, (Schoonjans *et al.*, 1996) y *SCD* (Schoonjans *et al.*, 1995). *PPARG* es transcripcionalmente activado por los genes *CEBPB* y *CEBPD* (Wu *et al.*, 1995), y una vez expresados, *PPARG* y *CEBPA* se regulan la expresión de forma recíproca (Schwarz *et al.*, 1997).

#### 6.1.1.2. *CEBPs*

Todos los miembros de la familia *CEBP* contienen un dominio de activación, una región básica de unión al ADN y un dominio de dimerización rico en leucina. El dominio C-terminal altamente conservado y rico en leucinas denominado *leucine zipper* (bZIP) confiere la capacidad de unir ADN (Lekstrom-Himes y Xanthopoulos, 1998) y de formar homo y hetero-dímeros con otros miembros de la familia *CEBP*. Esta dimerización es requisito indispensable para que puedan unirse específicamente al ADN (Landschulz *et al.*, 1989; Lekstrom-Himes y Xanthopoulos, 1998).

Las isoformas *CEBPA*, *CEBPB* y *CEBPD* son las que participan en la regulación de la adipogénesis (Hu *et al.*, 1995). Se expresan principalmente en el tejido adiposo, hígado, intestino y pulmón (Lekstrom-Himes y Xanthopoulos, 1998) y participan en procesos como la proliferación y diferenciación celular o el control del metabolismo, aunque se encuentran también implicados en los procesos inflamatorios (Shi *et al.*, 2010). Hay genes que sólo se inducen por la activación de *CEBPA* y no necesitan de la expresión de *PPARG* pero éstos están más relacionados con la sensibilidad a la insulina y al mantenimiento de la expresión del gen *PPARG* (Otto y Lane, 2005). Por esto se

considera al *PPARG* como diferenciador central de la adipogénesis (Bonnet *et al.*, 2010; Lee y Ge, 2014).

### 6.1.1.3. *WNTs*

Son una familia de 19 glicoproteínas secretadas que actúan por vía autocrina o parácrina y que regulan el crecimiento celular (Bodine *et al.*, 2006). Pueden causar proliferación o apoptosis celular y diferenciación o mantenimiento de células precursoras dependiendo del contexto (Novakofski, 2004). En el proceso de adipogénesis, *WNT* bloquea completamente la inducción de los dos factores de transcripción anteriormente citados *PPARG* y *CEBPA*. La inhibición de la señalización *WNT* en preadipocitos tiene como resultado la diferenciación espontánea de éstos en adipocitos (Moreno-Navarrete y Fernández-Real, 2012). Dentro de la vía de señalización *WNT*, se ha demostrado que el gen *WNT10B* es altamente expresado en preadipocitos y que inhibe la adipogénesis (Longo *et al.*, 2004). De hecho, su expresión en adipocitos resulta en una reducción del 50% en la masa del tejido adiposo. *WNT10B* actúa como un estabilizador de la *B-catenina*, la cual se une al receptor de andrógenos y se transloca al núcleo en respuesta a la testosterona donde interactúa con los factores de transcripción de *TCF/LEF* para inhibir la adipogénesis.

### 6.1.2. Principales reguladores de la adipogénesis: genes y enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico

#### 6.1.2.1. *FABP*

Las proteínas de unión a ácidos grasos (*FABP*) son una familia de proteínas citoplasmáticas de bajo peso molecular que intervienen en el transporte y el metabolismo de ácidos grasos intracelulares (Jurie *et al.*, 2007). Se ha registrado la existencia de dos isoformas, la *H-FABP*, expresada en varios tejidos como el tejido cardíaco y músculo esquelético y la *A-FABP* que es exclusiva de los adipocitos (Jurie *et al.*, 2007). El gen *FABP4* se expresa principalmente en los adipocitos (Gerbens *et al.*, 1998) y codifica para proteínas relacionadas con la captación y transporte de ácidos grasos de cadena larga (Kaikaus *et al.*, 1990; Gregoire *et al.*, 1998). La cantidad de *FABP4* en las células es proporcional al metabolismo de ácidos grasos (Veerkamp y van

Moerkerk, 1993) y la expresión de este gen se ha relacionado con la hipertrofia de los adipocitos (Pickworth *et al.*, 2011). Estas proteínas están implicada en el transporte intracelular de los ácidos grasos de cadena larga e intervienen en la incorporación de estas moléculas a las células, uniéndose a ellos y transportándolos al interior de las células, por lo que está implicado en el proceso de deposición de la grasa (Thaller *et al.*, 2003; Michal *et al.*, 2006; Barendse *et al.*, 2009).

#### **6.1.2.2. FAS**

La ácido graso sintasa (*FAS*) es una de las enzimas que regulan la síntesis *de novo* de ácidos grasos junto con la acetil coenzima A carboxilasa sintasa (*ACC*) (Joseph *et al.*, 2010). Se trata de un complejo multi-enzimático formado por una sola cadena polipeptídica con siete actividades enzimáticas y se encarga de convertir el malonil CoA en acil CoA. Actúa en las etapas finales de la síntesis de los ácidos grasos saturados que se desarrollan en el citoplasma celular, donde se encuentra el complejo enzimático. *FAS* es codificada por el gen *FASN* cuya transcripción está sujeta a un control nutricional y hormonal estricto en los tejidos que sintetizan lípidos, principalmente el adiposo y el hepático.

#### **6.1.2.3. ACC**

La enzima *ACC* presenta dos isoformas, la *ACCA* y *ACCB* codificadas por los genes *ACACA* y *ACACB* respectivamente. *ACACA* se expresa mayoritariamente en el tejidos adiposo, el hígado y la glándula mamaria de animales en el periodo de lactación y cataliza el paso limitante para la formación de ácidos grasos saturados de cadena mientras que el gen *ACACB* se expresa principalmente en el corazón y en el músculo esquelético (Tong, 2005).

#### **6.1.2.4. SCD**

La esteroil coenzima A desaturasa (*SCD*) es una enzima lipogénica clave debido a su papel en la conversión de los ácidos grasos saturados (*SFA*) a monoinsaturados (*MUFA*) mediante la introducción de un doble enlace *cis* entre los carbonos 9 y 10 (Joseph *et al.*, 2010). En bovino, se han descrito dos isoformas del gen que codifica para esta enzima: *SCD1*, que se expresa predominantemente en el tejido adiposo, aunque también en el

hígado y glándula mamaria y *SCD5* expresado principalmente en cerebro (Lengi y Corl, 2008, Barton *et al.*, 2010).

#### 6.1.2.5. *LPL*

La *LPL*, a diferencia del resto de las enzimas mencionadas, es una enzima lipolítica relacionada con el metabolismo de los triglicéridos. Se localiza en los capilares del tejido adiposo y muscular y gracias a su activación por la apoproteína C-II (proteína que se une a lípidos) hidroliza los triglicéridos en ácidos grasos libres y glicerol dentro del adipocito. La regulación transcripcional de la *LPL* es compleja y se lleva a cabo mediante diferentes mecanismos dependiendo su regulación del tejido y el tipo celular en el que está siendo expresada. En diversos estudios se ha podido comprobar que la expresión del gen *LPL* es inducida por los genes *PPARG* y *PPARA* como respuesta a la presencia de determinados ácidos grasos en hígado, tejido adiposo y macrófagos (Schoonjans *et al.*, 1996; Michaud y Renier, 2001). Aun así, el aumento en la expresión del gen no siempre va acompañado por un aumento en la actividad de la enzima llegando incluso a producirse el efecto contrario según indican los estudios realizados Ranganathan y Kern (1998) y Gbaguidi *et al.* (2002).

#### 6.1.2.6. *SREBPs*

Las proteínas de unión a elementos reguladores de esterol (*SREBPs*) juegan un papel central en la homeostasis energética promoviendo la glucólisis, la lipogénesis y la adipogénesis (Hoashi *et al.*, 2007). Activan directamente la expresión de más de 30 genes implicados en la síntesis y absorción de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos, así como el cofactor *NADPH* necesario para sintetizar estas moléculas (Brown y Goldstein, 1997; Edwards *et al.*, 2000; Sakakura *et al.*, 2001). A pesar de que la síntesis de colesterol y ácidos grasos presentan mecanismos de regulación diferentes, ambas rutas están sometidas a un control nutricional a nivel transcripcional que está mediado por los factores de transcripción *SREBFs* (Shimano, 2001). En mamíferos son codificadas por los genes *SREBF1*, del cual se han descrito dos isoformas (*SREBF1a* y *SREBF1c*), y *SREBF2* (Horton *et al.*, 2002). El *SREBF1c* activa los genes lipogénicos además de estar involucrado en la adipogénesis. Algunos de los genes diana del *SREBF1c* son *ACACA*, *FASN*, *SCD* (Horton *et al.*, 2002) y *PPARG* (Shimano, 2001). En cambio,



el *SREBF1a* y *SREBF2* modulan la expresión de los genes relacionados con el metabolismo del colesterol (Shimano, 2001).

#### 6.1.2.7. Adipoquinas: leptina y adiponectina

Entre las adipoquinas (citoquinas secretadas por los adipocitos) más importantes se encuentran la leptina y la adiponectina, dos proteínas especialmente multifuncionales. Ambas están implicadas en la sensibilización a la insulina, sobre todo la adiponectina (Ebihara *et al.*, 2001; Oral *et al.*, 2002).

La actividad de la leptina esta mediada por una familia de receptores específicos de la superficie celular presentes en muchos tipos de células diferentes. Uno de estos receptores se encuentra en el hipotálamo (Mercer *et al.*, 1996) y parece que regula el comportamiento de la alimentación (Ghilardi *et al.*, 1996; Vaisse *et al.*, 1996). La leptina, codificada por el gen *LEP*, está involucrada en el procesamiento de los lípidos, ingesta de alimentos y regulación del balance energético (Hoggard *et al.*, 1997; Barb *et al.*, 2001; Trayhurn *et al.*, 2011). Puede alterar el nivel de glucocorticoides circulantes (De Vos *et al.*, 1998) y presenta efectos autocrinos en el tejido adiposo, de forma que los adipocitos que acumulan gran cantidad de lípidos pueden sintetizarla y prevenir que dicha acumulación continúe (Fruhbeck *et al.*, 2001). Los estudios que determinaron que la interrupción de la actividad de la leptina causaba obesidad en los roedores junto con el hecho de que sólo los adipocitos produzcan leptina, provocaron que se centrara la atención en el adipocito como un regulador del metabolismo energético (Hwang *et al.*, 1997).

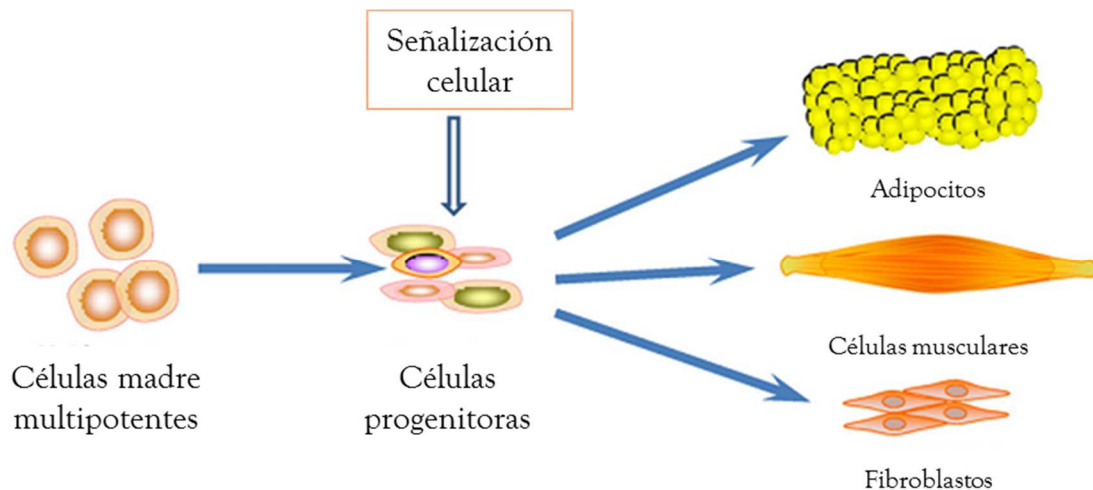
La adiponectina, codificada por el gen *ADIPOQ*, es una proteína secretada por el tejido adiposo que participa en el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos. Interviene en la sensibilización a la insulina, promueve la diferenciación de los adipocitos y mejora la acumulación de lípidos en los adipocitos maduros (Fu y Luo, 2005). Se considera como un componente de la comunicación entre el adipocito, los tejidos sensibles a la insulina y la función vascular (Palomer *et al.*, 2005). Mediante la acción de *ADIPOQ*, la adipogénesis se acelera asegurando una expresión marcada y prolongada de los principales reguladores de la adipogénesis *PPARG* y *CEBPA* (Combs *et al.*, 2002; Fu y Luo, 2005). En los adipocitos completamente diferenciados, su expresión aumenta la

tasa de acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas mejorando la eficacia de la síntesis de triacilglicerol y también el transporte de glucosa como respuesta a la insulina (Fu y Luo, 2005; Shetty *et al.*, 2012). En contraste con *LEP*, los adipocitos más pequeños segregan más *ADIPOQ* lo que provoca que éstos experimenten una mayor diferenciación y una mayor acumulación lipídica (Fu y Luo., 2005). Una de las características más importantes de la adiponectina es que, a diferencia de otras adipoquinas, su expresión en el tejido adiposo y su concentración plasmática se reducen en individuos con alta grasa corporal (Arita *et al.*, 1999; Beltowski, 2003; Ouchi *et al.*, 2003). Además de lo anteriormente mencionado, la adiponectina también está relacionada con procesos de inflamación y con la respuesta inmune (Haugen y Drevon, 2007).

## 7. DESARROLLO DEL TEJIDO ADIPOSO INTRAMUSCULAR; RELACIÓN CON LA MIOGÉNESIS Y LA FIBROGÉNESIS

Las diferencias presentadas por el depósito IM en comparación con el resto de depósitos grasos en el potencial proliferativo de los preadipocitos, su respuesta a factores adipogénicos o su metabolismo se deben en parte a su localización particular, ya que se encuentra embebida entre fibras musculares y tejido conectivo (Gardan *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Hausman *et al.*, 2008; Rajesh *et al.*, 2010).

Dado que las células musculares, los fibroblastos que forman el tejido conectivo y los adipocitos derivan del mismo *pool* de CMM (Figura 2.12) (Du *et al.*, 2010b; Tang y Lane, 2012), se considera que el desarrollo del tejido graso IM podría estar afectado por factores miogénicos y fibrogénicos, además de los adipogénicos, y por determinadas citoquinas como las mioquinas y adipoquinas, aunque los mecanismos implicados son todavía ampliamente desconocidos.



**Figura 2.12.** Divergencia de las células madre mesenquimáticas en el linaje miogénico y fibroadipogénico durante el desarrollo muscular fetal (Adaptado de Du *et al.*, 2010b).

Como ya se ha indicado, además de los marcadores adipogénicos, se cree que los factores fibrogénicos y miogénicos están implicados en los procesos que llevan a la formación y regulación de la grasa IM. En la figura 2.13 se representan algunos de los genes ya descritos que están relacionados con los tres procesos estudiados. En el presente trabajo se seleccionaron los genes relacionados con la miogénesis *Myf5* y *MyoD*, implicados en la determinación temprana de los mioblastos (Bergstrom y Tapscott, 2001) y el gen *MyoG*, que, como ya se ha mencionado, interviene en procesos de diferenciación de mioblastos. En cuanto a los marcadores fibrogénicos, se seleccionaron el gen *FN1* implicado en la adhesión y movilidad celular y en el mantenimiento de la forma celular y el gen *TGFβ1*, el cual estimula la formación de fibroblastos de la piel en adultos mediante la liberación de *FGF2* por medio de su receptor *FGFR1* (Armatas *et al.*, 2014). Ambos genes; *FGF2* y *FGFR1*, fueron también estudiados. Con el fin de estudiar la adipogénesis se han estudiado los principales reguladores de este proceso, *PPARG* y *CEBPA*, que se regulan de forma recíproca entre ellos y activan genes implicados en la diferenciación de adipocitos (Rosen y Spiegelman, 2006); el gen de diferenciación temprana de adipocitos *Zfp423* (Gupta *et al.*, 2010) se seleccionó también como marcador relacionado con la adipogénesis. Como marcador adipogénico propio de

adipocitos maduros, se seleccionó el gen *FABP4* involucrado en el transporte y metabolismo intracelular de ácidos grasos (Shin, 2012; Smathers *et al.*, 2011). El gen *WNT10B* fue también seleccionado dado que su expresión reprime la capacidad de los preadipocitos para diferenciarse (Ross *et al.*, 2000), bloqueando completamente la inducción de los dos factores de transcripción mencionados anteriormente.

Además de estos factores y como se ha mencioando hay distintas citoquinas que también pueden tener un papel importante sobre el desarrollo de la adipogénesis. De estas citoquinas se seleccionaron dos adipoquinas: la leptina, codificada por el gen *LEP* implicada en el procesamiento de los lípidos, apetito y balance energético y la adiponectina, codificada por el gen *ADIPOQ*, que tiene un papel en la oxidación de los ácidos grasos. También se estudió una mioquina, la miostatina, codificada por el gen *Mstn*, que es un regulador negativo del desarrollo muscular (Figura 2.13)

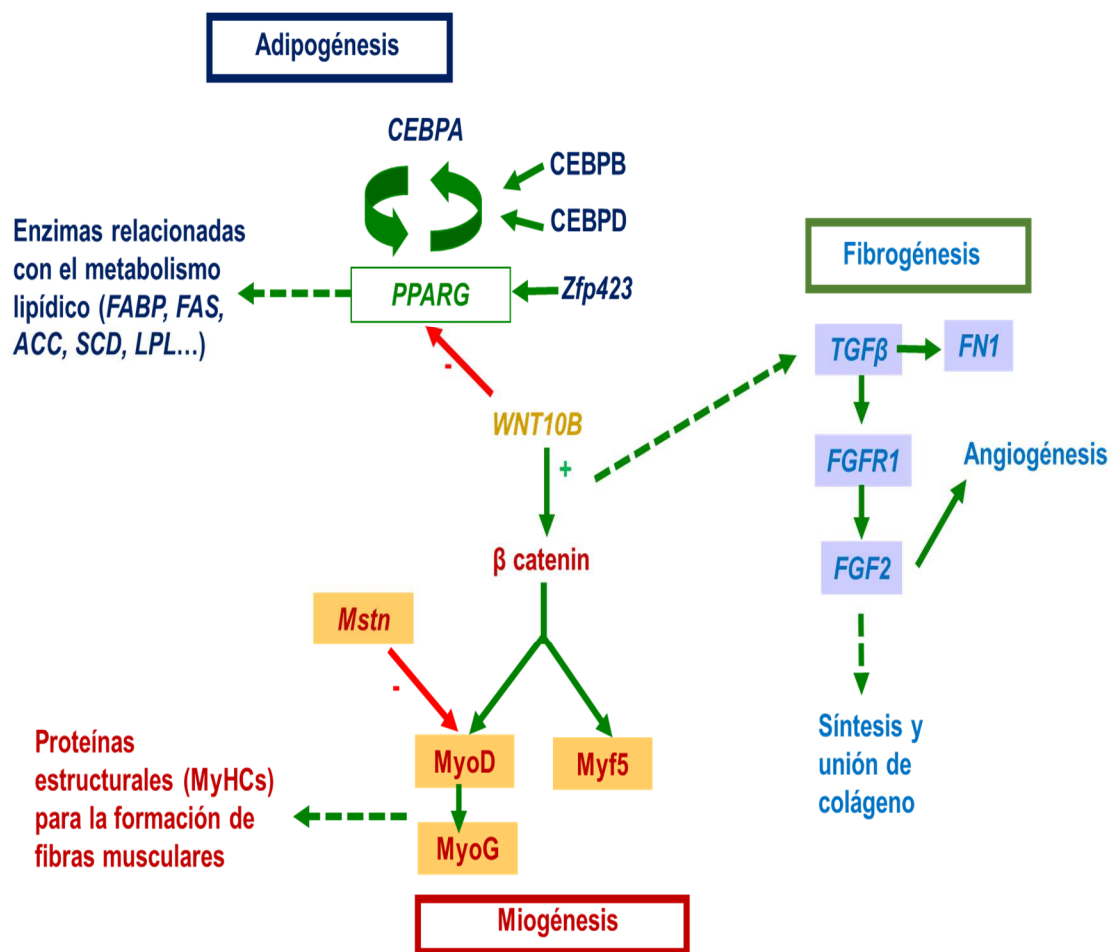


Figura 2.13. Relación entre algunos de los principales factores involucrados en la adipogénesis, miogénesis y fibrogénesis.

## 8. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA COMO TÉCNICA DE ESTUDIO.

Con objeto estudiar la expresión génica de los genes anteriormente citados y, de esta forma, identificar los factores implicados en el desarrollo del tejido intramuscular, una técnica cada vez más utilizada debido a su alta sensibilidad y elevada reproducibilidad es la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real, también llamada PCR cuantitativa (qPCR) (Orlando *et al.*, 1998; Lockey *et al.*, 1998; Bustin, 2000; Pfaffl y Hageleit, 2001). Esta técnica permite la detección y cuantificación de la expresión génica de forma precisa y sensible mediante el análisis de las diferencias de ARN mensajero que presentan diferentes genes bajo las mismas condiciones experimentales. A pesar del amplio número de trabajos en los que se han utilizado estas técnicas de medición y análisis del ARN mensajero y de los esfuerzos realizados para aumentar la repetitividad de los resultados, sigue resultando complicado establecer un diseño experimental óptimo (Bustin *et al.*, 2009). Esto puede ser debido a que la variabilidad asociada a un experimento en el que la expresión génica se cuantifica por medio de qPCR depende, además del gen estudiado, de otros factores como son el animal o el tejido de los que se ha tomado la muestra. La capacidad para detectar una expresión diferencial entre los genes estudiados puede estar limitada por la alta variabilidad asociada a los resultados en experimentos de RT-qPCR (Steibel *et al.*, 2009). Esto, junto con la confusión entre la variación biológica y la variación asociada al trabajo experimental, podría dificultar la detección de diferencias con relevancia biológica (Tichopad *et al.*, 2009).

Normalmente, un experimento de qPCR típico diseñado para comprobar si existe una diferencia en la expresión génica entre grupos conlleva el muestreo del material biológico, la extracción del ARN, la transcripción inversa (RT) del ARN mensajero en ADNc y la amplificación de este ADNc mediante qPCR. La adquisición de la muestra constituye la primera fuente potencial de variabilidad experimental puesto que los resultados del análisis del ARN pueden ser fácilmente perturbados por los métodos de recolección de muestras y procesamiento (Bustin, 2009). Con el fin de minimizar la variabilidad entre las repeticiones biológicas, algunos autores han recomendado, por ejemplo, el uso de la misma cantidad de ARN total en cada reacción (Taylor *et al.*, 2010). En el estudio realizado por Tichopad *et al.*, (2009) se afirma que algunos experimentos

se diseñan y realizan poniendo excesivo énfasis en el paso de amplificación, teniendo menos en cuenta los pasos precedentes y su contribución al error de medición. Un diseño experimental correcto que minimice la variabilidad es esencial para una mejor interpretación de los datos. Por lo tanto, analizar los factores que aportan más variabilidad a los resultados de los experimentos planteados conducirá a que se puedan detectar de manera más eficiente cambios en la expresión génica, de menor magnitud pero con un efecto biológico relevante, en procesos como el de la deposición de GIM.

## 9. REFERENCIAS

- AFNA. Memoria AFNA 2015. 2016.
- Ahrens M, Ankenbauer T, Schroder D, Hollnagel A, Mayer H, Gross G. Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell Biol.* 1993;12(10):871-80. 10.1089/dna.1993.12.871.
- Albrecht E, Gotoh T, Ebara F, Xu JX, Viergutz T, Nurnberg G, *et al.* Cellular conditions for intramuscular fat deposition in Japanese Black and Holstein steers. *Meat Sci.* 2011;89(1):13-20. 10.1016/j.meatsci.2011.03.012.
- Allen CE. Importance of adipose tissue in the meat industry. *Proc. Meat Ind. Res. Conf.* p 1. 1969.
- Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T, *et al.* Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ). *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273(10):5678-84.
- Aparicio G. *Zootecnia especial. Etnología Conpendiada.* 4º edición. Córdoba. España.1960.
- Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 2001;81(3):1269-304.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257(1):79-83.
- Armatas AA, Pratsinis H, Mavrogonatou E, Angelopoulou MT, Kouroumalis A, Karamanos NK, *et al.* The differential proliferative response of fetal and adult human skin fibroblasts to TGF-beta is retained when cultured in the presence of fibronectin or collagen. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(8):2635-42. 10.1016/j.bbagen.2014.04.004.

- Asano H, Yamada T, Hashimoto O, Umemoto T, Sato R, Ohwatari S, *et al.* Diet-induced changes in Ucp1 expression in bovine adipose tissues. *Gen Comp Endocrinol.* 2013;184:87-92.
- ASPINA. Memoria de actividades. 2015.
- Astruc T. Connective tissue: structure, function and influence on meat quality. In: Devine C, Dikeman M, editors. *Encyclopedia of Meat Sciences.* 2nd ed. Oxford: Elsevier Science; 2014a. p. 321-8.
- Astruc T. Muscle fiber types and meat quality. In: Devine C, Dikeman M, editors. *Encyclopedia of Meat Sciences.* 2nd ed. Oxford: Elsevier Science; 2014b. p. 6.
- Apponi L.H, Corbett A.H, Pavlath G.K, RNA-binding proteins and gene regulation in myogenesis. *Trends Pharmacol Sci.* 2011 Nov;32(11):652-8. doi: 10.1016/j.tips.2011.06.004.
- B.O.E. Orden de 7 de diciembre de 1988 por la que se reconocen oficialmente e inscriben en el Registro General, abierto a tal efecto, las Asociaciones de Criadores de ganado bovino de las razas puras, «Pirenaica» y «Fleckvieh». España. 1989. p. 1.
- Bailey AJ, Light ND. *Connective Tissue in Meat and Meat Products: Elsevier Applied Science;* 1989.
- Barb CR, Hausman GJ, Houseknecht KL. Biology of leptin in the pig. *Domest Anim Endocrinol.* 2001;21(4):297-317.
- Barendse W, Bunch RJ, Thomas MB, Harrison BE. A splice site single nucleotide polymorphism of the fatty acid binding protein 4 gene appears to be associated with intramuscular fat deposition in longissimus muscle in Australian cattle. *Anim Genet.* 2009;40(5):770-3. 10.1111/j.1365-2052.2009.01913.x.
- Barish GD, Narkar VA, Evans RM. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2006;116(3):590-7. 10.1172/JCI27955.
- Bartoň L, Kott T, Bureš D, Řehák D, Zahradkova R, Kottova B. The polymorphisms of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) genes and their association with the fatty acid profile of muscle and subcutaneous fat in Fleckvieh bulls. *Meat Sci.* 2010;85(1):15-20.
- Bełtowski J. Adiponectin and resistin—new hormones of white adipose tissue. *Medical Science Monitor.* 2003;9(2):RA55-RA61.
- Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(2). 10.1101/cshperspect.a008342.
- Bergstrom DA, Tapscott SJ. Molecular distinction between specification and differentiation in the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor family. *Mol Cell Biol.* 2001;21(7):2404-12. 10.1128/MCB.21.7.2404-2412.2001.

- Berkes CA, Tapscott SJ. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2005;16(4-5):585-95. 10.1016/j.semcdb.2005.07.006.
- Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev.* 1997;18(1):26-45. 10.1210/edrv.18.1.0292.
- Biressi S, Molinaro M, Cossu G. Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Dev Biol.* 2007;308(2):281-93. 10.1016/j.ydbio.2007.06.006.
- Blackely JB, H. *The Science of Animal Husbandry*. Ed. reston (4ª Ed). 1985.
- Bodine PV, Komm BS. Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006;7(1-2):33-9. 10.1007/s11154-006-9002-4.
- Bonnet M, Cassar-Malek I, Chilliard Y, Picard B. Ontogenesis of muscle and adipose tissues and their interactions in ruminants and other species. *Animal.* 2010;4(7):1093-109. 10.1017/S1751731110000601.
- Braissant O, Fougère F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, beta, and gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 1996;137(1):354-66.
- Brand-Saberi B. Genetic and epigenetic control of skeletal muscle development. *Ann Anat.* 2005;187(3):199-207. 10.1016/j.aanat.2004.12.018.
- Brandstetter AM, Picard B, Geay Y. Muscle fibre characteristics in four muscles of growing bulls: I. Postnatal differentiation. *Livestock Production Science.* 1998;53(1):15-23.
- Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997;89(3):331-40.
- Buckingham M. Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11(4):440-8.
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000;25(2):169-93.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-22. 10.1373/clinchem.2008.112797.
- Butterwith SC, Peddie D, Belloir B, Clinton M. Preadipocyte factor-1 expression in the mouse embryo and placenta. *Biochem Soc Trans.* 1996;24(2):164S.
- Chen YW, Nagaraju K, Bakay M, McIntyre O, Rawat R, Shi R, *et al.* Early onset of inflammation and later involvement of TGFbeta in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2005;65(6):826-34. 10.1212/01.wnl.0000173836.09176.c4.
- Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A. Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(1):16-24. 10.1016/j.tem.2008.09.002.



- Cianzio DS, Topel DG, Whitehurst GB, Beitz DC, Self HL. Adipose Tissue Growth in Cattle Representing Two Frame Sizes: Distribution among Depots<sup>1</sup>. *J Anim Sci.* 1982;55(2):305-12. 10.2527/jas1982.552305x.
- Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB, *et al.* Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPAR $\gamma$  agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology.* 2002;143(3):998-1007. 10.1210/endo.143.3.8662.
- CONAFE. Memoria CONAFE 2015. 2016.
- CONASPI. Informe y memoria de actividades 2014. 2015.
- Corah LM, M.: Declining quality grades: A review of factors reducing marbling deposition in beef cattle, *Certified Angus Beef News Releases-Research.* 2007.
- Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr.* 1994;14:99-129. 10.1146/annurev.nu.14.070194.000531.
- De Vos P, Lefebvre AM, Shrivu I, Fruchart JC, Auwerx J. Glucocorticoids induce the expression of the leptin gene through a non-classical mechanism of transcriptional activation. *European journal of biochemistry.* 1998;253(3):619-26.
- Devine CE, Ellery S, Averill S. Responses of different types of ox muscle to electrical stimulation. *Meat Sci.* 1984;10(1):35-51. 10.1016/0309-1740(84)90030-5.
- Du M, Huang Y, Das AK, Yang Q, Duarte MS, Dodson MV, *et al.* Meat Science and Muscle Biology Symposium: manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. *J Anim Sci.* 2013;91(3):1419-27. 10.2527/jas.2012-5670.
- Du M, Tong J, Zhao J, Underwood KR, Zhu M, Ford SP, *et al.* Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *J Anim Sci.* 2010a;88(13 Suppl):E51-60. 10.2527/jas.2009-2311.
- Du M, Yin J, Zhu MJ. Cellular signaling pathways regulating the initial stage of adipogenesis and marbling of skeletal muscle. *Meat Sci.* 2010b;86(1):103-9. 10.1016/j.meatsci.2010.04.027.
- Du M, Zhao JX, Yan X, Huang Y, Nicodemus LV, Yue W, *et al.* Fetal muscle development, mesenchymal multipotent cell differentiation, and associated signaling pathways. *J Anim Sci.* 2011;89(2):583-90. 10.2527/jas.2010-3386.
- Dutson TR, editor. Connective tissue. *Proceedings of the Meat Industry Research Conference; 1974; Washington District of Columbia: American Meat Institute Foundation.*
- Ebihara K, Ogawa Y, Masuzaki H, Shintani M, Miyanaga F, Aizawa-Abe M, *et al.* Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipotrophic diabetes. *Diabetes.* 2001;50(6):1440-8.

- Echeverría T. Raza vacuna Pirenaica. Evolución, situación actual y perspectivas. Ed. Imprenta de la Diputación foral de Navarra. Pamplona, España. 1975.
- Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1529(1-3):103-13.
- FAO. Buenas prácticas para la industria de la carne. 2007. <http://www.fao.org/3/a-y5454s/y5454s01.pdf>
- Fajas L, Fruchart J-C, Auwerx J. PPAR $\gamma$ 3 mRNA: a distinct PPAR $\gamma$  mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett*. 1998;438(1-2):55-60.
- Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*. 2006;4(4):263-73. 10.1016/j.cmet.2006.07.001.
- Flint DJV, R.G. Hormones and adipose tissue growth. *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications*1993.
- Francetic T, Li Q. Skeletal myogenesis and Myf5 activation. *Transcription*. 2011;2(3):109-14. 10.4161/trns.2.3.15829.
- French MH. Razas europeas de ganado bovino. Vol I. Roma1968.
- Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Salvador J. Leptin-induced lipolysis opposes the tonic inhibition of endogenous adenosine in white adipocytes. *FASEB J*. 2001;15(2):333-40. 10.1096/fj.00-0249com.
- Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res*. 2005;46(7):1369-79. 10.1194/jlr.M400373-JLR200.
- Gardan D, Gondret F, Louveau I. Lipid metabolism and secretory function of porcine intramuscular adipocytes compared with subcutaneous and perirenal adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(2):E372-80. 10.1152/ajpendo.00482.2005.
- Gbaguidi FG, Chinetti G, Milosavljevic D, Teissier E, Chapman J, Olivecrona G, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists decrease lipoprotein lipase secretion and glycated LDL uptake by human macrophages. *FEBS Lett*. 2002;512(1-3):85-90.
- Gerbens F, Jansen A, van Erp AJ, Harders F, Meuwissen TH, Rettenberger G, *et al*. The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pigs. *Mamm Genome*. 1998;9(12):1022-6.
- Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(13):6231-5.
- Ghosh J, Murphy MO, Turner N, Khwaja N, Halka A, Kielty CM, *et al*. The role of transforming growth factor beta1 in the vascular system. *Cardiovasc Pathol*. 2005;14(1):28-36. 10.1016/j.carpath.2004.11.005.

- González Gallardo A, Varela-Echavarría A, Shimada Miyasaka A, Mora Izaguirre O. Diferenciación in vitro de preadipocitos de tejido adiposo bovino. *Técnica pecuaria en México*. 2008;46(2).
- Gosselin LE, Williams JE, Deering M, Brazeau D, Koury S, Martinez DA. Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. *Muscle Nerve*. 2004;30(5):645-53. 10.1002/mus.20150.
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*. 1998;78(3):783-809.
- Guo T, Jou W, Chanturiya T, Portas J, Gavrilova O, McPherron AC. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. *PLoS One*. 2009;4(3):e4937. 10.1371/journal.pone.0004937.
- Gupta RK, Arany Z, Seale P, Mepani RJ, Ye L, Conroe HM, *et al*. Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature*. 2010;464(7288):619-23. 10.1038/nature08816.
- Hall JB, Hunt M. Collagen solubility of A-maturity bovine longissimus muscle as affected by nutritional regimen. *J Anim Sci*. 1982;55(2):321-8.
- Hammond JA. Physiological limits to intensive production in animals. *British Agricultural Bulletin*. 1952;4:24.
- Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013;19(10):1252-63. 10.1038/nm.3361.
- Haugen F, Drevon CA. Activation of nuclear factor-kappaB by high molecular weight and globular adiponectin. *Endocrinology*. 2007;148(11):5478-86. 10.1210/en.2007-0370.
- Hausman D, DiGirolamo M, Bartness T, Hausman G, Martin R. The biology of white adipocyte proliferation. *Obesity reviews*. 2001;2(4):239-54.
- Hausman GJ, Basu U, Wei S, Hausman DB, Dodson MV. Preadipocyte and adipose tissue differentiation in meat animals: influence of species and anatomical location. *Annu Rev Anim Biosci*. 2014;2:323-51. 10.1146/annurev-animal-022513-114211.
- Hausman GJ, Dodson MV, Ajuwon K, Azain M, Barnes KM, Guan LL, *et al*. Board-invited review: the biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. *J Anim Sci*. 2009;87(4):1218-46. 10.2527/jas.2008-1427.
- Hausman GJ, Poulos SP, Pringle TD, Azain MJ. The influence of thiazolidinediones on adipogenesis in vitro and in vivo: potential modifiers of intramuscular adipose tissue deposition in meat animals. *J Anim Sci*. 2008;86(14 Suppl):E236-43. 10.2527/jas.2007-0219.
- Heinze PH, Smit MC, Naudé RT, Boccard RL, editors. Influence of breed and age on collagen content and solubility of some ovine and goat muscles. . Proc 32nd Meet Eur Meat Res Workers; 1986; INRA, Theix, Francia.

- Hennebry A, Berry C, Sirienn V, O'Callaghan P, Chau L, Watson T, *et al.* Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;296(3):C525-34. 10.1152/ajpcell.00259.2007.
- Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:425-56. 10.1146/annurev-pathol-011110-130246.
- Hirai S, Matsumoto H, Hino N, Kawachi H, Matsui T, Yano H. Myostatin inhibits differentiation of bovine preadipocyte. *Domest Anim Endocrinol.* 2007;32(1):1-14.
- Hoashi S, Ashida N, Ohsaki H, Utsugi T, Sasazaki S, Taniguchi M, *et al.* Genotype of bovine sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mamm Genome.* 2007;18(12):880-6. 10.1007/s00335-007-9072-y.
- Hocquette JF, Ortigues-Marty I, Pethick D, Herpin P, Fernandez X. Nutritional and hormonal regulation of energy metabolism in skeletal muscles of meat-producing animals. *Livestock Production Science.* 1998;56(2):115-43. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(98\)00187-0](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(98)00187-0).
- Hocquette JFC-M, I.; Listrat, A.; Jurie, C.; Jailler, R.; Picard, B., editor. Some recent advances in muscle biology and its regulation by nutrition : consequences for bovine meat quality. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*; 2001.
- Hocquette J.F Endocrine and metabolic regulation of muscle growth and body composition in cattle. *Animal.* 2010;4(11):1797-809.
- Hocquette JF, Botreau R, Picard B, Jacquet A, Pethick DW, Scollan ND. Opportunities for predicting and manipulating beef quality. *Meat Sci.* 2012;92(3):197-209. 10.1016/j.meatsci.2012.04.007.
- Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(20):11073-8.
- Hood RL, Allen CE. Cellularity of bovine adipose tissue. *J Lipid Res.* 1973;14(6):605-10.
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002;109(9):1125-31. 10.1172/JCI15593.
- Hu E, Tontonoz P, Spiegelman BM. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1995;92(21):9856-60.
- Hutley L, Shurety W, Newell F, McGeary R, Pelton N, Grant J, *et al.* Fibroblast growth factor 1: a key regulator of human adipogenesis. *Diabetes.* 2004;53(12):3097-106.
- Hwang CS, Loftus TM, Mandrup S, Lane MD. Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997;13:231-59. 10.1146/annurev.cellbio.13.1.231.

- Hwang YH, Kim GD, Jeong JY, Hur SJ, Joo ST. The relationship between muscle fiber characteristics and meat quality traits of highly marbled Hanwoo (Korean native cattle) steers. *Meat Sci.* 2010;86(2):456-61. 10.1016/j.meatsci.2010.05.034.
- Indurain G, Beriain MJ, Sarries MV, Insausti K. Effect of weight at slaughter and breed on beef intramuscular lipid classes and fatty acid profile. *Animal.* 2010;4(10):1771-80. 10.1017/S1751731110000923.
- Jeong JY, Ibrahim M, Kim MJ, So K, Jeong YD, Park S, *et al.* Comparisons of extracellular matrix-related gene expression levels in different adipose tissues from Korean cattle. *Livestock Science.* 2017;198:138-46. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.02.020>.
- Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, *et al.* Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol.* 2009;5(3):e1000324. 10.1371/journal.pcbi.1000324.
- Joo ST, Kim GD, Hwang YH, Ryu YC. Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics. *Meat Sci.* 2013;95(4):828-36. 10.1016/j.meatsci.2013.04.044.
- Joseph SJ, Pratt SL, Pavan E, Rekaya R, Duckett SK. Omega-6 fat supplementation alters lipogenic gene expression in bovine subcutaneous adipose tissue. *Gene regulation and systems biology.* 2010;4:91.
- Jurie C, Cassar-Malek I, Bonnet M, Leroux C, Bauchart D, Boulesteix P, *et al.* Adipocyte fatty acid-binding protein and mitochondrial enzyme activities in muscles as relevant indicators of marbling in cattle. *J Anim Sci.* 2007;85(10):2660-9. 10.2527/jas.2006-837.
- Kadler KE, Hill A, Canty-Laird EG. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20(5):495-501. 10.1016/j.ceb.2008.06.008.
- Kaikaus RM, Bass NM, Ockner RK. Functions of fatty acid binding proteins. *Experientia.* 1990;46(6):617-30.
- Karlsson A, Enfalt AC, Essen-Gustavsson B, Lundstrom K, Rydhmer L, Stern S. Muscle histochemical and biochemical properties in relation to meat quality during selection for increased lean tissue growth rate in pigs. *J Anim Sci.* 1993;71(4):930-8.
- Kempster AJ. Fat partition and distribution in the carcasses of cattle, sheep and pigs: A review. *Meat Sci.* 1981;5(2):83-98. 10.1016/0309-1740(81)90007-3.
- Kennedy L, Shi-Wen X, Carter DE, Abraham DJ, Leask A. Fibroblast adhesion results in the induction of a matrix remodeling gene expression program. *Matrix Biol.* 2008;27(4):274-81. 10.1016/j.matbio.2008.01.004.
- Keren A, Tamir Y, Bengal E. The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;252(1-2):224-30. 10.1016/j.mce.2006.03.017.

- Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2548-56. 10.1210/jc.2004-0395.
- Kokta TA, Dodson MV, Gertler A, Hill RA. Intercellular signaling between adipose tissue and muscle tissue. *Domest Anim Endocrinol.* 2004;27(4):303-31. 10.1016/j.domaniend.2004.05.004.
- Kollias HD, McDermott JC. Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2008;104(3):579-87. 10.1152/jappphysiol.01091.2007.
- Kopp J. Evolution qualitative du collagène musculaire de bovin en fonction de l'âge des animaux. Conséquences sur la tendreté de la viande. *Bull Techn CRZV.* 1971;5:7.
- Kopp J. Tendresse de la viande bovine: principaux facteurs de variation liés à l'âge des animaux. *Bull Techn CRZV.* 1976;24:9.
- Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science.* 1989;243(4899):1681-8.
- Lau DC. Nature and nurture in adipocyte development and growth. *Int J Obes.* 1990;14 Suppl 3:153-7.
- Lawrence TLJ, Fowler VR. *Growth of Farm Animals: CABI Pub.; 2002.*
- Lee EJ, Malik A, Pokharel S, Ahmad S, Mir BA, Cho KH, *et al.* Identification of genes differentially expressed in myogenin knock-down bovine muscle satellite cells during differentiation through RNA sequencing analysis. *PLoS One.* 2014;9(3):e92447. 10.1371/journal.pone.0092447.
- Lee JE, Ge K. Transcriptional and epigenetic regulation of PPARgamma expression during adipogenesis. *Cell Biosci.* 2014;4:29. 10.1186/2045-3701-4-29.
- Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(16):9306-11. 10.1073/pnas.151270098.
- Lefaucheur L. A second look into fibre typing-relation to meat quality. *Meat Sci.* 2010;84(2):257-70. 10.1016/j.meatsci.2009.05.004.
- Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(3):107-14. 10.1016/j.tem.2008.11.005.
- Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, Schupp M, Schug J, Cristancho A, *et al.* PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev.* 2008;22(21):2941-52. 10.1101/gad.1709008.
- Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem.* 1998;273(44):28545-8.
- Lengi AJ, Corl BA. Comparison of pig, sheep and chicken SCD5 homologs: Evidence for an early gene duplication event. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2008;150(4):440-6. 10.1016/j.cbpb.2008.05.001.

- Lepetit J. Collagen contribution to meat toughness: Theoretical aspects. *Meat Sci.* 2008;80(4):960-7. 10.1016/j.meatsci.2008.06.016.
- Listrat A, Lebret B, Louveau I, Astruc T, Bonnet M, Lefaucheur L, *et al.* How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality. *ScientificWorldJournal.* 2016;2016:3182746. 10.1155/2016/3182746.
- Lizaso G, Beriain MJ, Horcada A, Chasco J, Purroy A. Effect of intended purpose (dairy/beef production) on beef quality. *Canadian Journal of Animal Science.* 2011;91(1):97-102. 10.4141/cjas10078.
- Lockey C, Otto E, Long Z. Real-time fluorescence detection of a single DNA molecule. *Biotechniques.* 1998;24(5):744-6.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., *et al.* 2008. *Biología celular y molecular.* Médica Panamericana.
- Longo KA, Wright WS, Kang S, Gerin I, Chiang SH, Lucas PC, *et al.* Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. *J Biol Chem.* 2004;279(34):35503-9. 10.1074/jbc.M402937200.
- Louveau I, Perruchot MH, Bonnet M, Gondret F. Invited review: Pre- and postnatal adipose tissue development in farm animals: from stem cells to adipocyte physiology. *Animal.* 2016;10(11):1839-47. 10.1017/S1751731116000872.
- MacDougald OA, Mandrup S. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(1):5-11.
- MAPAMA. 2015. Caracterización del Sector Vacuno de carne 2015. [http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercadosganaderos/caracterizaciondelsectorvacunodecarne2015\\_tcm7-267233.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercadosganaderos/caracterizaciondelsectorvacunodecarne2015_tcm7-267233.pdf).
- MAPAMA 2016. Encuesta Ganadera bovino. Noviembre 2016. [http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/resultados\\_provisionales\\_nov2016\\_bovino\\_webmapama\\_tcm7-449517.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/resultados_provisionales_nov2016_bovino_webmapama_tcm7-449517.pdf)
- MAPAMA. Ternera. [http://www.mapama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/ternera\\_tcm7-315435.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/ternera_tcm7-315435.pdf)
- Marques BG, Hausman DB, Martin RJ. Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of hyperplastic obesity. *Am J Physiol.* 1998;275(6 Pt 2):R1898-908.
- May SG, Savell JW, Lunt DK, Wilson JJ, Laurenz JC, Smith SB. Evidence for preadipocyte proliferation during culture of subcutaneous and intramuscular adipose tissues from Angus and Wagyu crossbred steers. *J Anim Sci.* 1994;72(12):3110-7.
- McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(23):12457-61.
- Megeney LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol.* 1995;73(9-10):723-32.



- Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett.* 1996;387(2-3):113-6.
- Merkel RA. Química de los tejidos animales. III. Carbohidratos. In: Price JF, Schweigert BS, editors. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. Zaragoza: acribia; 1994.
- Michal JJ, Zhang ZW, Gaskins CT, Jiang Z. The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. *Anim Genet.* 2006;37(4):400-2. 10.1111/j.1365-2052.2006.01464.x.
- Michaud SE, Renier G. Direct regulatory effect of fatty acids on macrophage lipoprotein lipase: potential role of PPARs. *Diabetes.* 2001;50(3):660-6.
- Mok GF, Sweetman D. Many routes to the same destination: lessons from skeletal muscle development. *Reproduction.* 2011;141(3):301-12. 10.1530/REP-10-0394.
- Moncaut N, Rigby PW, Carvajal JJ. Dial M(RF) for myogenesis. *FEBS J.* 2013;280(17):3980-90. 10.1111/febs.12379.
- Moreno-Navarrete JM, Fernández-Real JM. Adipocyte differentiation. *Adipose tissue biology: Springer; 2012.* p. 17-38.
- Muchenje V, Dzama K, Chimonyo M, Strydom PE, Hugo A, Raats JG. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: A review. *Food Chemistry.* 2009;112(2):279-89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.103>.
- Nakamura MT, Yudell BE, Loo JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2014;53:124-44. 10.1016/j.plipres.2013.12.001.
- Neubauer M, Fischbach C, Bauer-Kreisel P, Lieb E, Hacker M, Tessmar J, *et al.* Basic fibroblast growth factor enhances PPARgamma ligand-induced adipogenesis of mesenchymal stem cells. *FEBS Lett.* 2004;577(1-2):277-83. 10.1016/j.febslet.2004.10.020.
- Nishimura T. Role of extracellular matrix in development of skeletal muscle and postmortem aging of meat. *Meat Sci.* 2015;109:48-55. 10.1016/j.meatsci.2015.05.015.
- Novakofski J. Adipogenesis: usefulness of in vitro and in vivo experimental models. *J Anim Sci.* 2004;82(3):905-15.
- Nuernberg K, Dannenberger D, Nuernberg G, Ender K, Voigt J, Scollan ND, *et al.* Effect of a grass-based and a concentrate feeding system on meat quality characteristics and fatty acid composition of longissimus muscle in different cattle breeds. *Livestock Production Science.* 2005;94(1-2):137-47. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2004.11.036>.
- Nugent MA, Iozzo RV. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32(2):115-20.
- Olson EN, Klein WH. bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev.* 1994;8(1):1-8.



- Oral EA, Ruiz E, Andewelt A, Sebring N, Wagner AJ, Depaoli AM, *et al.* Effect of leptin replacement on pituitary hormone regulation in patients with severe lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(7):3110-7. 10.1210/jcem.87.7.8591.
- Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M. Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med.* 1998;36(5):255-69. 10.1515/CCLM.1998.045.
- Otto TC, Lane MD. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2005;40(4):229-42. 10.1080/10409230591008189.
- Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14(6):561-6. 10.1097/01.mol.0000103609.38789.96.
- Oury MP, Dumont R, Jurie C, Hocquette JF, Picard B. Specific fibre composition and metabolism of the rectus abdominis muscle of bovine Charolais cattle. *BMC Biochem.* 2010;11:12. 10.1186/1471-2091-11-12.
- Palomer X, Perez A, Blanco-Vaca F. [Adiponectin: a new link between obesity, insulin resistance and cardiovascular disease]. *Med Clin (Barc).* 2005;124(10):388-95.
- Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy research and technique.* 2000;50(6):500-9.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
- Picard B, Cassar-Malek I. Evidence for expression of IIb myosin heavy chain isoform in some skeletal muscles of Blonde d'Aquitaine bulls. *Meat Sci.* 2009;82(1):30-6. 10.1016/j.meatsci.2008.11.022.
- Picard B, Lebret B, Cassar-Malek I, Liaubet L, Berri C, Le Bihan-Duval E, *et al.* Recent advances in omic technologies for meat quality management. *Meat Sci.* 2015;109:18-26. 10.1016/j.meatsci.2015.05.003.
- Picard B, Lefaucheur L, Berri C, Duclos MJ. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reprod Nutr Dev.* 2002;42(5):415-31.
- Picard BH, G.; Geay, Y.; Contractile differentiation of bovine masseter muscle. *Basic Appl. Myol.* 1996;6(5).
- Pickworth CL, Loerch SC, Velleman SG, Pate JL, Poole DH, Fluharty FL. Adipogenic differentiation state-specific gene expression as related to bovine carcass adiposity. *J. Anim. Sci.* 2011;89(2): 355-366. doi: 10.2527/jas.2010-3229.
- Pope M, Budge H, Symonds M. The developmental transition of ovine adipose tissue through early life. *Acta Physiologica.* 2014;210(1):20-30.
- Purslow PP. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. *Meat Sci.* 2005;70(3):435-47. 10.1016/j.meatsci.2004.06.028.

- Pyatt N, Berger L, Faulkner DB, Walker P, Rodriguez-Zas S. Factors affecting carcass value and profitability in early-weaned Simmental steers: I. Five-year average pricing. *J Anim Sci.* 2005a;83(12):2918-25.
- Pyatt NA, Berger LL, Faulkner DB, Walker PM, Rodriguez-Zas SL. Factors affecting carcass value and profitability in early-weaned Simmental steers: II. Days on feed endpoints and sorting strategies. *J Anim Sci.* 2005b;83(12):2926-37.
- Rajesh RV, Heo GN, Park MR, Nam JS, Kim NK, Yoon D, *et al.* Proteomic analysis of bovine omental, subcutaneous and intramuscular preadipocytes during in vitro adipogenic differentiation. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 2010;5(3):234-44. 10.1016/j.cbd.2010.06.004.
- Ranganathan S, Kern PA. Thiazolidinediones inhibit lipoprotein lipase activity in adipocytes. *J Biol Chem.* 1998;273(40):26117-22.
- Ríos R, Carneiro I, Arce VM, Devesa J. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2002;282(5):C993-C9.
- Robelin J. Cellularity of bovine adipose tissues: developmental changes from 15 to 65 percent mature weight. *J Lipid Res.* 1981;22(3):452-7.
- Robelin J. Growth of adipose tissues in cattle; partitioning between depots, chemical composition and cellularity. A review. *Livestock Production Science.* 1986;14(4):349-64.
- Robelin J, Picard B, Lustrat A, Jurie C, Barboiron C, Pons F, *et al.* Myosin expression in semitendinosus muscle during fetal development of cattle: immunocytochemical and electrophoretic analyses. *Reprod Nutr Dev.* 1993;33(1):25-41.
- Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell.* 2008;135(2):240-9. 10.1016/j.cell.2008.09.036.
- Rodgers BD, Garikipati DK. Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review. *Endocr Rev.* 2008;29(5):513-34. 10.1210/er.2008-0003.
- Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(12):885-96. 10.1038/nrm2066.
- Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 2006;444(7121):847-53. 10.1038/nature05483.
- Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, *et al.* Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science.* 2000;289(5481):950-3.
- Sakakura Y, Shimano H, Sone H, Takahashi A, Inoue N, Toyoshima H, *et al.* Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286(1):176-83. 10.1006/bbrc.2001.5375.
- Salvadori C, Peters IR, Day MJ, Engvall E, Shelton GD. Muscle regeneration, inflammation, and connective tissue expansion in canine inflammatory myopathy. *Muscle Nerve.* 2005;31(2):192-8. 10.1002/mus.20252.

- Sartorelli V, Caretti G. Mechanisms underlying the transcriptional regulation of skeletal myogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2005;15(5):528-35. 10.1016/j.gde.2005.04.015.
- Savell JW, Cross HR. The Role of Fat in the Palatability of Beef, Pork, and Lamb. In: Council NR, Agriculture B, Products CTOINAA, editors. *Designing Foods: Animal Product Options in the Marketplace*: National Academies Press; 1988.
- Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells basic and clinical implications for novel cellbasedtherapies. *Stem Cells.* 2007;25(4):818-27.
- Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, *et al.* PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 1996;15(19):5336-48.
- Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, *et al.* Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem.* 1995;270(33):19269-76.
- Schoonmaker JP, Fluharty FL, Loerch SC, Turner TB, Moeller SJ, Wulf DM. Effect of weaning status and implant regimen on growth, performance, and carcass characteristics of steers. *J Anim Sci.* 2001;79(5):1074-84.
- Schwarz EJ, Reginato MJ, Shao D, Krakow SL, Lazar MA. Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPbeta-mediated transcription. *Mol Cell Biol.* 1997;17(3):1552-61.
- Serra X, Guerrero L, Guardia MD, Gil M, Sanudo C, Panea B, *et al.* Eating quality of young bulls from three Spanish beef breed-production systems and its relationships with chemical and instrumental meat quality. *Meat Sci.* 2008;79(1):98-104. 10.1016/j.meatsci.2007.08.005.
- Shetty S, Ramos-Roman MA, Cho YR, Brown J, Plutzky J, Muise ES, *et al.* Enhanced fatty acid flux triggered by adiponectin overexpression. *Endocrinology.* 2012;153(1):113-22. 10.1210/en.2011-1339.
- Shi X, Liu S, Metges CC, Seyfert H-M. C/EBP-beta drives expression of the nutritionally regulated promoter IA of the acetyl-CoA carboxylase-alpha gene in cattle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms.* 2010;1799(8):561-7.
- Shimano H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res.* 2001;40(6):439-52.
- Shin S-C, Heo J-P, Chung E-R. Genetic variants of the FABP4 gene are associated with marbling scores and meat quality grades in Hanwoo (Korean cattle). *Mol Biol Rep.* 2012;39(5):5323-30.
- Singh K, Dilworth FJ. Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors. *Febs Journal.* 2013;280(17):3991-4003.
- Smathers RL, Petersen DR. The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. *Hum Genomics.* 2011;5(3):170-91.

- Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, *et al.* Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453(7196):783-7. 10.1038/nature06902.
- Steibel JP, Poletto R, Coussens PM, Rosa GJ. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics*. 2009;94(2):146-52. 10.1016/j.ygeno.2009.04.008.
- Stewart C, Rittweger J. Adaptive processes in skeletal muscle: molecular regulators and genetic influences. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*. 2006;6(1):73.
- Taga H, Bonnet M, Picard B, Zingaretti MC, Cassar-Malek I, Cinti S, *et al.* Adipocyte metabolism and cellularity are related to differences in adipose tissue maturity between Holstein and Charolais or Blond d'Aquitaine fetuses. *J Anim Sci*. 2011;99(3):711-21. 10.2527/jas.2010-3234.
- Tajbakhsh S, Buckingham M. The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Curr Top Dev Biol*. 2000;48:225-68.
- Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:715-36. 10.1146/annurev-biochem-052110-115718.
- Tang QQ, Otto TC, Lane MD. CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(3):850-5. 10.1073/pnas.0337434100.
- Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(26):9607-11. 10.1073/pnas.0403100101.
- Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, *et al.* White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science*. 2008;322(5901):583-6. 10.1126/science.1156232.
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*. 2010;50(4):S1-5. 10.1016/j.ymeth.2010.01.005.
- Thaller G, Kühn C, Winter A, Ewald G, Bellmann O, Wegner J, *et al.* DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Anim Genet*. 2003;34(5):354-7.
- Tichopad A, Kitchen R, Riedmaier I, Becker C, Stahlberg A, Kubista M. Design and optimization of reverse-transcription quantitative PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(10):1816-23. 10.1373/clinchem.2009.126201.
- Tong J, Zhu MJ, Underwood KR, Hess B, Ford S, Du M. AMP-activated protein kinase and adipogenesis in sheep fetal skeletal muscle and 3T3-L1 cells. *J Anim Sci*. 2008;96(6):1296-305.

- Tong L. Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005;62(16):1784-803.
- Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*. 1994a;8(10):1224-34.
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 1994b;79(7):1147-56.
- Totland GK, Kryvi H. Distribution patterns of muscle fibre types in major muscles of the bull (*Bos taurus*). *Anat Embryol (Berl)*. 1991;184(5):441-50.
- Totland GK, Kryvi H, Slinde E. Composition of muscle fibre types and connective tissue in bovine *M. semitendinosus* and its relation to tenderness. *Meat Sci*. 1988;23(4):303-15. 10.1016/0309-1740(88)90014-9.
- Trayhurn P, Drevon CA, Eckel J. Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Arch Physiol Biochem*. 2011;117(2):47-56. 10.3109/13813455.2010.535835.
- Trujillo ME, Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev*. 2006;27(7):762-78. 10.1210/er.2006-0033.
- Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res*. 2011;2(4):236-40. 10.4103/2231-4040.90879.
- Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE, Jr., Stoffel M, Friedman JM. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and *ob/ob* mice but not *db/db* mice. *Nat Genet*. 1996;14(1):95-7. 10.1038/ng0996-95.
- Veerkamp JH, van Moerkerk HT. Fatty acid-binding protein and its relation to fatty acid oxidation. *Mol Cell Biochem*. 1993;123(1-2):101-6.
- Vernon RG. The growth and metabolism of adipocytes. In Buttery P.J., Haynes N.B., Lindsay D.B. (Ed.), *Control and Manipulation of animal growth* 1986.(pp. 67-83). Londres: Butterworths.
- Vézinhét. Etude du tissu adipeux chez l'agneau et la lapin après le naissance. Montpellier: Université des sciences et techniques du Languedoc; 1976.
- Vigouroux C, Caron-Debarle M, Le Dour C, Magré J, Capeau J. Molecular mechanisms of human lipodystrophies: from adipocyte lipid droplet to oxidative stress and lipotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(6):862-76.
- Wang EA, Israel DI, Kelly S, Luxenberg DP. Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors*. 1993;9(1):57-71.

- Weiss A, McDonough D, Wertman B, Acakpo-Satchivi L, Montgomery K, Kucherlapati R, *et al.* Organization of human and mouse skeletal myosin heavy chain gene clusters is highly conserved. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999;96(6):2958-63.
- Wertz A, Berger L, Walker P, Faulkner D, McKeith F, Rodriguez-Zas S. Early-weaning and postweaning nutritional management affect feedlot performance, carcass merit, and the relationship of 12th-rib fat, marbling score, and feed efficiency among Angus and Wagyu heifers. *J Anim Sci.* 2002;80(1):28-37.
- Wertz E, Berge L, Walker P, Faulkner D, McKeith F, Rodriguez-Zas S. Early weaning and postweaning nutritional management affect feedlot performance of Angus x Simmental heifers and the relationship of 12th rib fat and marbling score to feed efficiency. *J Anim Sci.* 2001;79(7):1660-9.
- Wood JD, Enser M, Fisher AV, Nute GR, Sheard PR, Richardson RI, *et al.* Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci.* 2008;78(4):343-58. 10.1016/j.meatsci.2007.07.019.
- Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, *et al.* Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell.* 1999;3(2):151-8.
- Wu Z, Xie Y, Bucher N, Farmer SR. Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes Dev.* 1995;9(19):2350-63.
- Zhang JW, Klemm DJ, Vinson C, Lane MD. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J Biol Chem.* 2004;279(6):4471-8. 10.1074/jbc.M311327200.
- Zhang W, Behringer RR, Olson EN. Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev.* 1995;9(11):1388-99.
- Zhou X, Li D, Yin J, Ni J, Dong B, Zhang J, *et al.* CLA differently regulates adipogenesis in stromal vascular cells from porcine subcutaneous adipose and skeletal muscle. *J Lipid Res.* 2007;48(8):1701-9. 10.1194/jlr.M600525-JLR200.
- Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen X-N, Noya D, Rao MS, *et al.* Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1995;92(17):7921-5.

## CHAPTER 3

### OBJECTIVES AND EXPERIMENTAL APPROACH





## **1. OBJECTIVES**

The main objective of this work was to analyse the expression of key factors determining adipogenesis and the expression of factors involved in myogenesis and fibrogenesis and to investigate their relationship with the development of adipocytes and the intramuscular fat deposition in beef cattle, taking into account the variability presented between muscles and animals.

A second objective was to determine the main sources of experimental variation in the assays of quantification of adipogenesis, myogenesis and fibrogenesis gene expression in order to optimize the experimental design that would allow to detect biologically relevant differences.

Based on the above mentioned general objectives, the following specific objectives were established:

1. To study the intramuscular fat content, the adipocyte size distribution and the expression of the key genes involved in adipogenesis in different muscles of Pirenaica breed.
2. To determine the intramuscular fat content, the adipocyte size distribution and the expression of the key adipogenic genes in different muscles of two breeds with distinct tendency to accumulate fat (Pirenaica and Friesian).
3. To analyse the expression of genes related to myogenesis and fibrogenesis in the muscles and breeds studied and its relationship with the expression of the adipogenic markers.
4. To analyse the sources of experimental variation that contribute to the RT-qPCR variability in order to determine the appropriate experimental designs.

## 2. EXPERIMENTAL APPROACH

In order to achieve the former objectives, an experimental approach based in three Studies was established (Figure 3.1).

The **Study I** aimed to achieve the first and the fourth specific objectives. For that purpose, samples of the muscles of *longissimus thoracis*, *semitendinosus*, *masseter* and *sternomandibularis* muscles were taken from four Pirenaica bulls (11.94 months of age  $\pm 0.94$ ).

The samples were analysed for the amount of fat, protein percentage and moisture and the adipocyte size distribution of the fat in the four muscles was determined. The expression of the key adipogenic genes: *PPARG*, *CEBPA*, *FABP4* and *WNT10B* was quantified following a nested design that included the animal (A), the sampling or RNA extraction (S), the reverse transcription (RT) and the quantitative polymerase chain reaction (qPCR): [(nA=4) x (nS=3) x (nRT=2) x (nqPCR=2)]

The **Study II** was focused in the second and the fourth specific objectives. In order to perform a breed comparison as well as muscle comparison four Friesian bulls (9.73 months of age  $\pm 0.05$ ) and four Pirenaica bulls were used to obtain samples from the muscles *longissimus thoracis* and *masseter*.

The samples were analysed for the amount of fat, protein percentage and moisture and the adipocyte size distribution of the fat in the four muscles. The expression of the key adipogenic genes *PPARG*, *CEBPA*, *FABP4* and *WNT10B* was quantified following the previous nested design as described for the Study I.

In the **Study III**, addressed the third and fourth specific objectives. Then, the *longissimus thoracis* and *masseter* muscles of the Pirenaica and Friesian bulls were used to quantify the chemical traits (total and soluble collagen) and the expression of genes related to early adipogenesis (*Zfp423*), myogenesis (*Myf5*, *MyoD*, *MyoG*) and fibrogenesis (*FNI*,

*FGFR1, FGF2, TGFB1*), and the citoquinas (*LEP, ADIPOQ, Msnt*) was quantified, using the described nested design.

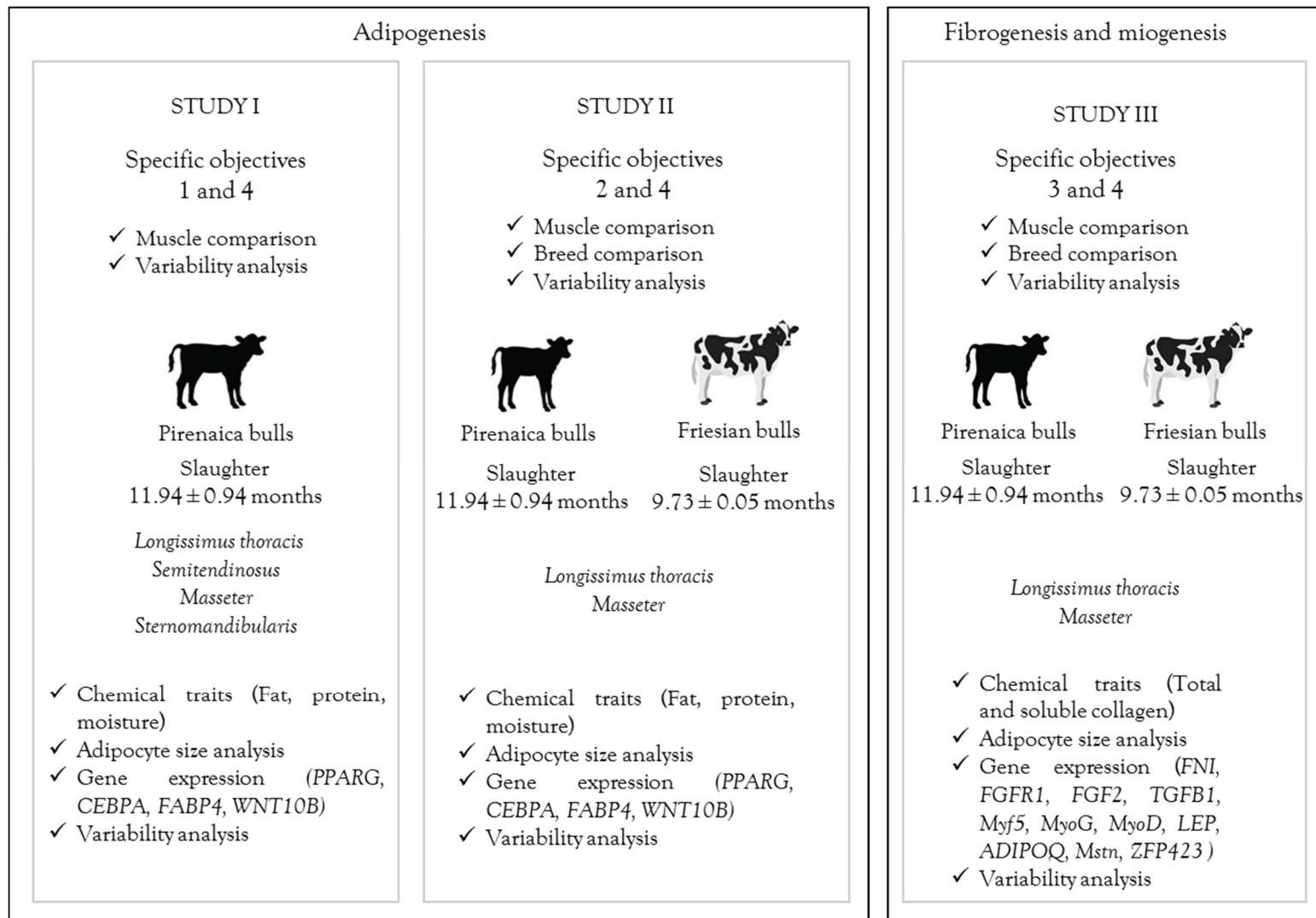


Figure 3.1. Experimental design

## CHAPTER 4

### MATERIALS AND METHODS



## 1. ANIMALS AND REARING CONDITIONS

The animals used in this study were young bulls from Pirenaica and Friesian breeds. Four Pirenaica bulls that belonged to ASPINA (Pirenaica breed association of Navarra) and had Quality Label “Ternera de Navarra” were reared under traditional conditions in two cattle farms: MC Labayen, Huici (Navarra, Spain) and BoviRiver SCI, Cabanillas (Navarra, Spain). The animals were kept with their mothers until 4-5 months of age when calves were weaned and feed with a standard growing diet and cereal straw, both “ad libitum” up to four-six months of age. From then and up to 12 months of age, the commercial endpoint, the young bulls were kept in large partially shaded pens and fed a standard fattening diet based on concentrate and cereal straw, both ad libitum. At slaughter, Pirenaica bulls had an average age of  $11.94 \pm 0.94$  months and an average carcass weight of  $323 \pm 18.00$  kg.

Four Friesian bulls born in France and later acquired by the cattle farm “Ganados Trave” in Binefar (Huesca, Spain) for their fattening, were studied. Friesian bulls were weaned at 2 days of age after taking colostrum, and then were fed with artificial milk and concentrates until 4-5 months of age. After this time, they were fed the same regimen as the Pirenaica bulls “ad libitum”. At the time of killing, Friesian bulls have an average age of  $9.73 \pm 0.05$  months and an average carcass weight of  $242 \pm 11.60$  kg.

### 1.1. Ethical approval

Animal care, handling and experimental procedures complied with international guidelines (European Union procedures on animal experimentation-Directive 2010/63/EU) that regulate the protection of animals used for scientific purposes (Union E. Directive 2010/63/EU), which define that for experiments carried out under standard production conditions, no approval from an ethics committee is required. The bulls were born and housed in commercial farms as described in previously. On the day of sampling, the bulls were transported to commercial abattoirs: “La Protectora” in Pamplona (Spain) and “Fribin” in Binefar (Spain) which had already issued the permission to undertake the sampling. Animal care and handling in the farm and during transportation followed European guidelines (Council Directive 2008/119/EC of 18 December 2008, Council Regulation (EC) No 1/2005). The slaughter was performed

by using stunning methods (non-penetrative captive bolt device followed immediately by bleeding) following the European Union regulations that regulate the protection of animals at the time of killing (Council Regulation, EC, No 1099/2009) (Union E. Council Regulation (EC) No. 1099/2009). Therefore, animals included in this experiment were subjected to the same welfare conditions as production animals in farms and abattoir and all efforts were made to minimize suffering.

## 2. SAMPLE COLLECTION

The Pirenaica and Friesian bulls were slaughtered in commercial abattoirs of Pamplona (Navarra; Spain) and Binéfar (Huesca, Spain) respectively following the directives and methods described in section 1.1. (Ethical approval). Sampling was performed immediately after slaughter. Samples of muscles *longissimus thoracis* (*LT*) at the 10th rib, *semitendinosus* (*ST*), *masseter* (*MS*), and *sternomandibularis* (*SM*) on the left side of the carcass were collected from the four Pirenaica bulls. Subcutaneous adipose tissue (*SAT*) at the 10th rib of the left carcass side was also collected from Pirenaica bulls. Similarly, samples of *LT* at the 10th rib and *MS* of the left carcass side were taken from the four Friesian bulls.

Muscle samples were trimmed of external fat and connective tissue and divided into portions as follows:

- Approximately 60 g of each muscle were labelled, divided into sub-samples for tissue chemical characterization, placed in individual bags in ice and stored at -20°C until use.
- Muscle and SAT samples of approximately 500 mg were taken for adipocyte size determination. Samples were placed in labelled test tubes and kept at 39°C in Tyrode solution (0.15 M NaCl, 6 mM KCL, 2 mM CaCL<sub>2</sub>, 6 mM C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.62) until their processing.
- Three muscle sub-samples intended for RNA extraction (approximately 20 g) were deep frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Similarly, three



SAT sub-samples of approximately 20 g each, were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use for RNA extraction.

### 3. CHEMICAL TRAITS

#### 3.1. Chemical fat percentage

The chemical fat percentage was determined in the muscles studied by the Soxhlet method (International Organization for Standardization-ISO 1443, 1973). A single sample per muscle was triturated, homogenized and divided into two sub-samples of approximately 5 g each. The samples were digested by adding 300 mL of 3M chloride acid 3N and boiled for one hour. Then the digestate was filtered, dried 8 hours at 70°C and placed into a Soxhlet flask connected with a previously weighed recipient (P1). Diethyl ether was added in the flask continuously during 6 hours and at 75-80°C, chemical fat was extracted by ether and then condensed in the recipient connected to the Soxhlet flask. After Soxhlet extraction was finished, the recipients with the condensed chemical fat were placed in a stove and then in a desiccator to cool to room temperature. Then, the recipients were weighed (P2) allowing the calculation of the chemical fat condensed in the recipient by using the following equation (Eq. 1):

$$\% \text{ Chemical fat} = \frac{P2-P1}{\text{Sample weighth } (\pm 5 \text{ g})} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

#### 3.2. Protein percentage

The Kjeldahl method was used to determine the protein percentage (Kjeldahl, 1883). For each muscle, a single sample was triturated, homogenized and divided into two sub-samples of approximately 0.5 g each. Samples were digested in 500 ml of sulphuric acid 96% for 2 hours. After the digestion, samples were transferred to the distillation apparatus in a Kjeldahl flask. Then 20 ml of sodium hydroxide 40 % were added to the digestion. Distillation took place until about 150 ml of condensate, rinsed the end of the condenser and the samples were titrated with chloride acid 0.1N. A blank test without sample was also run. Total nitrogen was determined by measuring the volume of chloride acid 0.1N used in the titration of samples (V HCL<sub>1</sub>) and blank (V HCL<sub>2</sub>) and transformed to protein percentage using the equation Eq. 2 and Eq. 3:

$$\text{Nitrogen \%} = \frac{(V_{HCL_1} - V_{HCL_2})}{\text{Sample weight } (\pm 0.5 \text{ g})} \times 0.001 \times 0.01 \times 14 \times 100 \text{ (Eq. 2)}$$

$$\text{Protein \%} = \text{Nitrogen \%} \times 6.25 \text{ (Eq. 3)}$$

### 3.3. Total and soluble collagen

Total and soluble collagen was quantified by measuring the total hydroxyproline according to the method described by Bergmann-Loxley (1963) and modified by Bonnet and Kopp (1986). The results of total collagen were expressed as mg of hydroxyproline per g of wet muscle and the results of soluble collagen were expressed as the percentage of the total amount of collagen. A single sample per muscle was triturated, homogenized and divided into two sub-samples of approximately 5 g each. For total collagen, the samples were digested using 50 ml of chloride acid 50% during 7 hours at 75-80°C and after digestion, the PH was adjusted to 6-7. For soluble collagen determination, the 5 g of sample were homogenized in distilled water. The samples were incubated at 77 °C for 2 hours, centrifuged at 500rpm for 10 minutes twice, and the supernatant was digested in chloride acid 50% for 7 hours at 75-80°C. In order to perform the total and soluble collagen determination, a calibration curve was performed. Then, 500 µl of Chloramine T and 500 µl of Enrich's/pDMAB reagent were added to the samples and incubated for 15 minutes at 65°C acquiring different grades of red colour that were measured using a spectrophotometer at 550nm. The hydroxyproline concentration of the samples was calculated using the standard curve prepared and collagen concentration was estimated using the following equation (Eq. 4):

$$\text{Collagen (mg/g)} = \frac{\text{Hydroxyproline concentration}}{\text{Sample weight } (\pm 5 \text{ g})} \times 8 \text{ (Eq. 4)}$$

### 3.4. Moisture percentage

For each muscle, approximately 3 g of sample were weighed in duplicates in two previously weighed recipients (P1). After a minimum of 12 hours in a stove at 100°C, the recipients were weighed again (P2) and the moisture percentage was calculated by the following equation (Eq. 5):

$$\text{Moisture \%} = \frac{P2 - P1}{P2 - \text{sample weight } (\pm 3 \text{ g})} \times 100 \text{ (Eq. 5)}$$

#### 4. ADIPOCYTE SIZE ANALYSIS

Adipocytes were extracted from the four muscles and the SAT following the technique described by Robdell (1964) slightly modified to extract intramuscular adipocytes (Soret *et al.*, 2016; Urrutia *et al.*, 2016). As indicated, the samples were transported to the laboratory in the Tyrode solution at 39°C within 20 min after slaughter. Then, using a thermal block to maintain the temperature at 39°C, connective tissue and blood vessels were removed by using scalpel and scissors and the tissues were minced and rinsed with saline serum. The samples were then digested by incubation for 90 min at 39°C in a flask with 5 ml of Medium 199 (Gibco 31150-022, Waltham, MA, USA) (pH: 7.0 to 7.4), 200 mg of bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and 5 or 10 mg of collagenase type II (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) for SAT and muscle respectively. After the collagenase digestion, adipocyte solutions were filtered through a 850 µm mesh size to remove tissue debris. Adipocyte size diameter was determined by measuring at least 200 cells per sample by image analysis (Albertí *et al.*, 2013). For that purpose, the cells were examined microscopically using an Olympus BH.2 microscope (Olympus Optical Co., Europa Combth Postfact 104908; 20034 Hamburg). Measurement of adipocyte size was performed using a program for the acquirement and storage of the images as well as for the processing of data (Image-Pro Plus 5.1, Media Cybernetics, Inc. Silver Spring MD 20910). It was established that adipocytes should meet a shape criteria, so adipocytes have a shape factor of 0.8-1 (shape factor of 0 indicating a straight line and 1 a perfect circle).

#### 5. RNA ISOLATION

##### 5.1. Muscle samples

A portion from each muscle sample was minced and pulverized in a previously cooled bowl using liquid nitrogen. To release the RNA from cells or tissues, 200 mg of the pulverized samples were placed in a 2 ml tube and homogenized with 1 ml of Trizol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Samples were incubated at room temperature for 5 minutes and centrifuged 10 minutes at 12,000 g and 4°C. Then the aqueous phase was transferred to a new 1.5 ml tube and 200 µl of chloroform was added. After mix

gently for 15 seconds and incubate during 3 minutes at room temperature, the tubes were centrifuged 15 minutes at 12,000 g and 4°C. The upper aqueous phase was placed again in a new 1.5 ml tube and one volume (usually 600 µl) of ethanol 70 % solution was added and mixed with the sample.

RNA isolation from the muscle samples was performed using the GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich Química, Madrid, Spain). In order to bind the RNA to the GenElute Binding Column, 700 µl of the lysate/ethanol mixture were placed on the column and then the samples were centrifuged 15 seconds at 12,000 g discarding the flow-through. To wash the RNA and remove the contaminants, 500 µl of Wash solution 1 were added to the samples. After spin 30 seconds at 12,000 g, columns were placed in a new collection tube and 500 µl of Wash solution 2 and the samples were centrifuged again 30 seconds at 12,000 g. The last step was repeated and then the purified RNA eluted by transferring the column to a new collection tube, adding 50 µl of elution solution to the column and spinning 1 minute at 12,000 g.

## 5.2. SAT samples

A portion from each SAT sample was cut and pulverized in a previously cooled bowl using liquid nitrogen. Then, in order to release the RNA from cells or tissues, 100 mg of the pulverized samples were placed in a 2 ml tube and homogenized with 1 ml of QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Hilden, Germany). Samples were then incubated at room temperature for 5 minutes and centrifuged 10 minutes at 12,000 g and 4°C. The aqueous phase was transferred to a new 1.5 ml tube and 200 µl of chloroform was added to the homogenate. After gently mix for 15 seconds, and incubate for 3 minutes at room temperature in the benchtop, the tubes were centrifuged 30 minutes at 12,000 g and 4°C. The upper aqueous phase was transferred again to a new 1.5 ml tube and one volume (usually 600 µl) of ethanol 70 % solution was added and mixed with the sample.

RNA isolation from the SAT samples was performed using the RNeasy Lipid Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). As for muscle samples, in order to bind RNA to Column, up to 700 µl lysate/ethanol were transferred to the RNeasy Mini spin Column placed in a 2ml collection tube. The samples were centrifuged 15 seconds at 12,000 g and the flow-through discarded. Then, 700 µl of buffer RW1 were added to the column and

centrifuged 15 seconds at 12,000 g to wash the RNA and remove contaminants. Briefly, 500 µl of Buffer RPE 1 were added and samples were centrifuged 15 seconds at 12,000 g. A total of 500 µl of Buffer RPE 2 were added to the column. After centrifuged 2 minutes at 12,000 g the purified RNA was eluted from the column placing the RNeasy Mini spin Column in a new 1.5 ml collection tube, adding 50 µl of RNase-free water directly to the spin column membrane and spinning 1 minute at 12,000 g.

### 5.3. RNA concentration and quality assessment

Concentration and purity of the muscle and SAT RNA was assessed by using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Madrid, Spain) by optical density quantification at 260 and 280 nm. The presence of proteins and PCR inhibitors was estimated by the 260/280 and 260/230 absorbance ratios considering values ranged from  $1.8 \pm 0.2$  and  $2.0 \pm 0.2$  respectively as acceptable.

## 6. GENE EXPRESSION STUDY

Expression of the following genes related to adipogenesis, fibrogenesis and myogenesis was analysed:

*Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPARG)*, *CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  (CEBPA)*, *fatty acid binding protein 4 (FABP4)*, *wingless-type MMTV integration site family, member 10B (WNT10B)*, *zinc finger protein 423 (ZFP423)*, *fibronectin (FN1)*, *fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)*, *fibroblast growth factor 2 (FGF2)*, *transforming growth factor  $\beta$  1 (TGF $\beta$ 1)*, *myogenic factor 5 (Myf5)*, *myogenic differentiation 1 (MyoD)*, *myogenin (MyoG)*, *myostatin (Mstn)* and *citoquines leptin (LEP)* and *adiponectin (ADIP)*.

### 6.1. cDNA synthesis

Prior to the cDNA synthesis, the RNA was treated with DNase using RQ1 RNases-Free DNase (Promega Corporation, Madison, WI, USA) as follows: 1 µl of RQ1 RNase-Free DNase 10x Reaction Buffer, 1 µl RQ1 RNase-Free DNase, from 1-8 µl of isolated RNA (final RNA concentration 750 ng) and DEPC water up to 10 µl.

Samples were incubated 30 minutes at 37°C; then 1 µl of RQ1 Stop solution was added and the samples were incubated for 10 minutes at 65°C.

Singled stranded cDNA was synthesized using PrimeScript RT Reagent (Takara, Japan) preparing a mix in PCR tubes for each sample containing: 2 µl of 5X Buffer, 0.5 µl of RT enzyme mix, 0.5 µl of Oligo dt primer (50µl), 0.5 µl of Randon primers 6 mer (100µM), 500ng of RNA (from 3.5 to 6.5 µl) and DEPC water up to a final volume of 10 µl. The samples were placed in the Gene Amp PRC System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and incubated 15 minutes at 37°C and 5 seconds at 85°C.

## 6.2. qPCR

The expression analysis was performed using a FX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Munich, Germany). The qPCR was conducted preparing a mix in PCR tubes for each sample containing: 5 µl of SYBR Premix Ex Taq (Takara, Japan), 0.5 µl of forward and reverse primers (10 µM), 1 µl of DNase-RNase Free water and DEPC water for a final volume of 7 µl.

The mix was distributed in 96-well clear Multiplate PCR plates, (Bio-Rad, Munich, Germany) and 3 µl of cDNA (1:5 dilution) were added to each well. Then the plate was sealed with Microseal `B` seal Seals (Bio-Rad, Munich, Germany) and placed in the FX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Munich, Germany), which incorporates the Bio-CFX Manger 3.0 program. The cycling conditions of qPCR included a first denaturation at 95°C for 30 seconds and 40 cycles of amplification consisted in a denaturation at 95°C for 5 seconds followed by a hybridization/elongation phase of 30 seconds at 60°C. The final steps of the qPCR-cycling program were 5 seconds at 65°C and 5 seconds at 95°C.

Dissociation curves and melting temperatures were examined for the presence of a single RT-qPCR product. The reactions that presented multiple peaks in the dissociation curve were performed again using different primers concentration in order to ensure their specificity. The reactions that presented none melting temperature were considered as failed and those that presented an amplification in the two negative controls (reactions carry out without sample) carried out for each gene in each plate were considered as

contaminated. To ensure the reliability of the data, the reactions considered as failed or contaminated were repeated. In addition, since each qPCR reaction was performed by duplicate, those replicates whose Cq value differed more than one unit were repeated. In order to perform a more detailed analysis, the Cq values were analysed using boxplot diagrams generated with SPSS software V22.0. Cq values above or below the upper or lower quartile respectively were considered as outliers and were studied carefully in order to determine whether they should be eliminated or not. An outlier may be due to the measurement variability or to an error related to the experimental procedures, so in order to identify outliers due to experimental errors, the amplification curves and the melting temperatures were examined as described previously. Therefore, the outliers that corresponded to errors in the experimental procedures were not considered.

### 6.3. Reference genes

The reliability of gene expression experiments using reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) depends on normalizing the cDNA abundance through stable reference genes. In order to identify the most suitable reference genes for the present study, *β-actin* (*ACTB*), *battenin* (*CNL3*), *ribosomal protein large PO subunit* (*RFLPO*), *peptidylprolyl isomerase A* (*PPIA*) and *topoisomerase II-beta* (*TOP2B*) were selected. Those genes were previously used in other experiments (Bonnet *et al.*, 2013; Waters *et al.*, 2009) and were selected for being the most stable reference genes in a wide range of parameters such as sex, age, nutrition, body mass index, depot origin and biopsy procedure. The expression of the reference genes was analysed following the same methodology described in the previous section “qPCR” using as a template a pooled cDNA of the four muscles and the four Pirenaica animals used in the current work. The results of the five reference genes amplification were analysed using RefFinder software (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>), a web-based tool that uses the algorithms geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), Normfinder (Andersen *et al.*, 2004), BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) and comparative  $\Delta Cq$  methods (Silver *et al.*, 2006). Considering the stability values resulted from the algorithms mentioned, RefFinder assigns a stability value to each gene and rank the tested reference genes according to it. Based on the stability study performed, the three genes that showed the higher values were *TOP2B*, *CNL3* and *ACTB* (Table 4.1). Vandesompele (2002) concluded that, in

order to measure expression levels accurately, normalization by multiple housekeeping genes instead of one is required. Therefore, two genes (*ACTB* and *TOP2B*) were chosen to as reference gene in the present work.

**Table 4.1.** RefFinder stability study results for the reference genes analysed.

Method	Order				
	1	2	3	4	5
Delta Cq	TOP2B	CNL3	ACTB	RFLPO	PPIA
BestKeeper	ACTB	TOP2B	CNL3	PPIA	RFLPO
NormFinder	TOP2B	CNL3	ACTB	RFLPO	PPIA
GeNorm	TOP2B/CNL3		RFLPO	ACTB	PPIA
RefFinder recommended	TOP2B	CNL3	ACTB	RFLPO	PPIA

<sup>1</sup>*ACTB*=  $\beta$ -actin; *CNL3*= battenin; *RFLPO*= ribosomal protein large PO subunit; *PPIA*= peptidylprolyl isomerase A; *TOP2B*=topoisomerase II-beta.

#### 6.4. Primers selection and design

Primers used in the present work were either taken from the bibliography or designed using the Primer3 software (Table 4.2) in order to amplify a 100-200 bp of the gene selected for the study. Primer specificity was checked using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) from the National Centre for Biotechnology Information (NCBI). All the primers were obtained from a commercial supplier (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).



**Table 4.2.** Oligonucleotide sequences, amplicon size and source of the adipogenic, fibrogenic, myogenic, genes, citoquines and reference genes selected.

Gene ID	Accession number	Gene	Primers <sup>1</sup>	bp <sup>2</sup>	Source
<i>Peroxisome proliferator activated receptor <math>\gamma</math></i>	NM_181024	<i>PPARG</i>	F:GTGAAGTTCAACGC ACTGGA R:ATGTCCTCAATGGG CTTCAC	113	Soret <i>et al.</i> , 2016
<i>CCAAT/enhancer-binding protein <math>\alpha</math></i>	NM_176784	<i>CEBPA</i>	F:TGGACAAGAACAGC AACGAG R:TTGTCACTGGTCAG CTCCAG	130	Soret <i>et al.</i> , 2016
<i>Fatty acid binding protein 4</i>	NM_174314.2	<i>FABP4</i>	F:CATCTTGCTGAAAG CTGCAC R:ACCCCATTCAAAC TGATGA	202	Bonnet <i>et al.</i> , 2013
<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 10B</i>	XM_005206363	<i>WNT10B</i>	F:AATGCAAGTGCCAT GGTACG R:GAGTTGCGGTTGTG AGTATCAATG	139	Soret <i>et al.</i> , 2016
<i>Zinc finger protein 423</i>	NM_001101893.1	<i>ZFP423</i>	F:GGATTCTCCGTGA CAGCA R:TCGTCTCATTCTCT CTCTCT	120	Duarte <i>et al.</i> 2013
<i>Fibronectin</i>	NM_001163778.1	<i>FN1</i>	F:GCGTGTCACCTGGG CTCCAC R:CTTGCTCCGGCAAG GTCCGGG	149	Duarte <i>et al.</i> , 2013
<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>	NM_001110207.1	<i>FGFR1</i>	F:AGGAGGATCGAGCC CACGGC R:CTTGCTCCGGCAAG GTCCGGG	166	Duarte <i>et al.</i> , 2013
<i>Fibroblast growth factor 2</i>	NM_174056.3	<i>FGF2</i>	F:GGAGCATCACCACG CTGCCA R:GTGGGTCGCTCTTC TCGCGG	165	Duarte <i>et al.</i> , 2013
<i>Transforming growth factor, <math>\beta</math> 1</i>	NM_001166068.1	<i>TGF<math>\beta</math>1</i>	F:AGCCAGGGGGATGT GCCA R:TAGCACGGGGTGA CCTCT	147	Duarte <i>et al.</i> , 2013
<i>Myogenic factor 5</i>	NM_174116.1	<i>Myf5</i>	F:AGACGCCTGAAGAA GGTCAA R:TGCCATCAGAGCAA CTTGAG	220	This study
		<i>MyoD</i>	F:TTCCGACGGCATGA TGGACTAC	72	

Myogenic differentiation 1	NM_001040 478.2		R:TAAGTGCGGTCGTA GCAGTTCC		Duarte <i>et al.</i> , 2013
Myogenin	NM_001111 325.1	MyoG	F:TACAGACGCCACA ATCTGCAC R:AGCGACATCCTCCA CTGTGATG	67	Duarte <i>et al.</i> , 2013
Leptin	NM_173928. 2	LEP	F:GGCTGTCCACAGGA GAAGAG R:AGTGAGAGGGAGCT GGAACA	233	This study
Adiponectin	NM_174742. 2	ADIPOQ	F:GTGGCTCTGATTCC ACACCT R:TCTCCAGGAGTGCC ATCTCT	208	This study
Myostatin	AF320998.1	Mstn	F:GTGTTGCAGAACTG GCTCAA R:AGGTGCCTTTGTCT GGCTTA	238	This study
$\beta$ -actin	BC_142413	ACTB	F:CGCCATGGATGATG ATATTGC R:AAGCGGCCTTGAC ATGC	65	Waters <i>et al.</i> , 2009
Topoisomerase II-beta	XM_0012547 09	TOP2B	F:CCGATGATGATGAC GACAAT R:TGCTATGGGAGATG CTTTGA	62	Bonnet <i>et al.</i> , 2013

<sup>1</sup>Primer direction. F= forward; R= Reverse.

<sup>2</sup> Amplicon Size in base pairs (bp).

## 6.5. Primers specificity

In order to check the primers specificity the following steps were undertaken:

Bovine DNA was amplified by PCR using the forward and reverse primers for each gene as described:

Buffer 10X	2.5 $\mu$ l
Cl <sub>2</sub> Mg (50 mM)	0.75 $\mu$ l
DNTps (10 mM)	0.5 $\mu$ l
Primer Forward (10 $\mu$ M)	0.8 $\mu$ l
Primer Reverse (10 $\mu$ M)	0.8 $\mu$ l
Taq polymerase (1u/ $\mu$ l)	1.25 $\mu$ l
DEPC water	17.4 $\mu$ l

DNA	1 $\mu$ l
Final volume (add DEPC water)	25 $\mu$ l

Thermal cycling conditions consisted in an initial denaturation at 95°C for 5 minutes followed by 40 cycles of amplification that included a denaturation step at 95°C for 30 seconds, annealing at 60°C for 30 seconds and extension at 72°C for 30 seconds followed by a final extension at 72°C for 10 min.

PCR products were visualised in a 2% agarose gel and cloned in NEB 10-beta Electrocompetent *E. coli* cells using the PGEMT-easy cloning system (Promega, Southampton, UK). In order to perform the ligation of the PCR product and the PGEMT-easy cloning system the following mix for each ligation was prepared.

PGEMT-easy (50 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ L
2X Rapid ligation Buffer	5 $\mu$ L
PCR product	3 $\mu$ L
T4 DNA Ligase (3u/ $\mu$ l)	1 $\mu$ L

The samples were incubated for 1 hour at room temperature and stored at -20°C until use.

The transformation was performed by adding 2  $\mu$ L of the PGEMT-easy cloning system ligated to the PCR product to approximately 25  $\mu$ L of NEB 10-beta Electrocompetent *E. coli* cells. The mixture was placed on 1 mm Electroporation Cuvettes (Bio-Rad, Munich, Germany) and electroporated at 1.25 V: 100  $\Omega$ , and 25  $\mu$ F (typical time constant is  $\sim$  4-5 milliseconds). After electroporation, 1 ml of liquid LB medium was added and the samples were incubated in agitation for 1 hour at 37°C. Briefly, 100  $\mu$ L of cells were spread on to a pre-warmed selective plate (LB + 100  $\mu$ l IPTG (100 mM) + 30  $\mu$ l X-Gal (40 mg/ml) + 15  $\mu$ l Ampicillin (100 mg/ml) and incubate for 8 hours to overnight at 37°C.

PGEMT-easy cloning system were removed using plasmid Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) after harvest one single colony of the transformed NEB 10-beta Electrocompetent *E. coli* cells in 5 ml in liquid LB overnight. Then, to pellet the

bacteria, 1.5 ml from the culture were transferred to a microcentrifuge and centrifuged 30 seconds at 12,000 g. Supernatant was discarded and samples were re-centrifuge removing any residual supernatant using a pipette. A total of 175 µl of Lysis buffer type 7 were added to the bacteria pellet and the pellet was thoroughly re-suspended. Briefly, 175 µl of Lysis buffer type 8 were added, mixing immediately by gentle inversion until solution becomes clear and viscous, 350 µl of Lysis buffer 9 were added and mixed immediately by gentle inversion until the precipitate were evenly dispensed. Then, the supernatant were transferred to an illustra plasmid mini column inside the collection tube, centrifuged 30 seconds at 12,000 g discarding flowthrough and 400 µl of Wash buffer type 1 were added to the column before centrifuge for 30 seconds at 12,000 g discarding flowthrough. The column were transferred into a flesh microcentrifuge tube and 100 µl of Elution bugger type 4 added directly onto the center of the column. After incubate the column for 30 seconds at room temperature and spin 30 seconds at 12,000 g, purified plasmids were stored at -20°C.

The purified plasmid containing the amplified PCR products were sequenced to verify their identity (Macrogen Europe, Amsterdam, The Netherlands) and all the amplicons were confirmed 100 % homologous to their target sequence.

#### **6.6. Primers efficiency**

In order to determine the primers efficiency, the PCR product of each gene was cloned using the PGEMT-easy cloning system (Promega) as described in the previous section “Primers specificity”. The PGEMT plasmids with the inserted PCR products, were serially diluted and qPCR was performed as described in the section “qPCR”. The trend line equation,  $y(x) = mx + b$ , where  $y(x)$  was the forecast of  $C_q$  for the cycle  $x$ ,  $x$  was the specified number of cycles,  $m$  was the slope (the increase per cycle) and  $b$  was the intercept of the trend line (the point at which the line crosses the  $y$  axis) were generated by graphing the log of the DNA concentration used *vs.* the  $C_q$  value obtained for the sample. Then, the standard curve method (Efficiency=  $10^{-1/\text{slope}}$ ) was applied (Rasmussen, 2001). The primers efficiencies ranged from 1.90 to 2.00 and  $R^2$  was close to 0.99 for all the genes (Table 4.3).

**Table 4.3.** Slopes, R<sup>2</sup> and Efficiency values for the adipogenic, fibrogenic, myogenic, genes, citoquinas and reference genes selected.

Gene	Slope <sup>1</sup>	(R <sup>2</sup> ) <sup>2</sup>	Efficiency <sup>3</sup>
PPARG <sup>4</sup>	-3.405	0.99	1.96
CEBPA	-3.493	0.98	1.93
FABP4	-3.546	0.98	1.91
WNT10B	-3.684	0.98	1.86
ZFP423	-3.371	0.99	1.98
FN1	-3.074	0.99	2.00
FGFR1	-3.350	0.99	1.99
FGF2	-3.179	0.97	1.97
TGFβ1	-3.211	0.99	2.00
Myf5	-3.323	0.99	2.00
MyoD	-3.344	0.99	1.99
MyoG	-3.285	0.99	2.00
LEP	-3.309	0.99	2.00
ADIPOQ	-3.160	0.99	2.00
Mstn	-3.314	0.99	1.99
ACTB	-3.450	0.96	1.94
TOP2B	-3.020	0.99	2.00

<sup>1</sup> Slope of the standard curve.

<sup>2</sup> R<sup>2</sup>= coefficient of determination of the standard curve

<sup>3</sup> Calculated as 10<sup>-1/Slope</sup>.

<sup>4</sup>PPARG = *peroxisome proliferator-activated receptor γ*; CEBPA = *CCAAT/enhancer-binding protein α*; FABP4 = *fatty acid binding protein 4*; WNT10B = *wingless-type MMTV integration site family, member 10B*; ZFP423= *Zinc finger protein 423*; FN1: *Fibronectin*; FGFR1= *Fibroblast growth factor receptor 1*; FGF2= *Fibroblast growth factor 2*; TGFβ1= *Transforming growth factor β 1*; Myf5= *Myogenic factor 5*; MyoG= *Myogenin*; MyoD= *Myogenic differentiation 1*; LEP= *Leptin*; ADIP= *Adiponectin*; Mstn = *Myostatin*, ACTB = *β-actin*; TOP2B = *Topoisomerase II-beta*.

## 7. STATISTICAL METHODS

### 7.1. Chemical traits

In order to determine if there were differences in chemical traits between the two breeds (Eq. 6) or the tissues (Eq. 7) used in the present work, data were analysed by one-way

analysis of the variance (ANOVA) following the models described in Eq.5 and Eq.6 below:

$$y_i = \mu + B_i + e_i \quad (\text{Eq. 6})$$

$$y_j = \mu + T_j + e_j \quad (\text{Eq. 7})$$

Where,  $Y_{ij}$  is the amount of the chemical trait measured,  $\mu$  is the mean,  $B_i$  is the fixed effect due to the breed analysed ( $i=1$  Pirenaica,  $i=2$  Friesian),  $T_j$  is the fixed effect of the tissue analysed ( $j=1$  LT,  $j=2$  ST,  $j=3$  MS,  $j=4$  SM,  $j=5$  SAT) or ( $j=1$  LT,  $j=2$  MS), and  $e$  is the random residual error.

## 7.2. Adipocyte size analysis

Many authors have based their unimodality-bimodality studies exclusively on the observation of the adipocyte cell size distribution (Hood and Allen, 1973; McLaughlin *et al.*, 2007; Jo *et al.*, 2012, Soret *et al.*, 2016). In the present work, in addition to observing the density diagrams generated, the adipocyte size distribution was studied with the AdipSD software (Alfonso and Mendizábal 2016). This software allows to determine if the adipocyte size distribution is unimodal or bimodal using the bimodality coefficient (BC) (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and Dip (Hartigan and Hartigan, 1985) tests. BC test is based on the number of observations, sample bias and excess of kurtosis. In a unimodal distribution, the BC value should be 0.555 or less. Higher BC values signify a bimodal distribution of the adipocytes; however, it may also indicate a strongly skewed unimodal distribution (Alfonso and Mendizábal 2016). Dip test is described as the maximum difference between the empirical distribution function, and the unimodal distribution function that minimizes that maximum difference. When P-value in the Dip test is less than 0.05, the unimodality hypothesis is not rejected. Contrary to BC, Dip is not implemented in most commonly used statistical packages, and in case of lack of convergence between the two tests, Dip was considered as the most appropriate measure (Freeman, 2013). However, it is important to note the limitations of the estimations described. Bimodality is a complex phenomenon and may thus potentially manifest in ways that are not captured by BC and Dip test (Freeman, 2013).

### 7.3. Gene Expression

Gene expression was analysed for each marker using the MIXED procedure (SAS 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), which is appropriate for completely randomized designs (Steibel *et al.*, 2009). To account for differences in amplification efficiencies (E) between the target and reference genes, Cq data were  $\log_2$  transformed using the expression  $\log_2 (E^{-Cq})$ .

Different sub-models were defined in order to consider the variance heterogeneity between gene and tissue for the following random factors: animal ( $A \sim N(0, \sigma^2_{Aij})$ ), sample ( $S \sim N(0, \sigma^2_{Sij})$ ), RT ( $R \sim N(0, \sigma^2_{Rij})$ ) or qPCR ( $e \sim N(0, \sigma^2_{eij})$ ). The sub-models were analysed using the MIXED procedure and, those that always converged to a solution, compared using corrected Akaike's and Schwarz's Bayesian information criterion values. Finally, the sub-model that presented heterogeneous variance for Sample and RT effects was chosen and different contrasts were defined to estimate gene expression differences (DIF) between tissues, as the minus the difference between normalized Cq values (Eq 8):

$$DIF = \left( y_{T_1 G_t} - \sum_{i=1}^2 y_{T_1 G_{r_i}} \right) - \left( y_{T_2 G_t} - \sum_{i=2}^2 y_{T_2 G_{r_i}} \right) \quad (\text{Eq. 8})$$

Where,  $G_t$ : target gene;  $G_r$ : reference genes.

Thus, the tissue, i.e. the muscles studied and SAT, and gene combination were considered according to the following model (Eq. 9):

$$y_{ijklmn} = \mu + T_i \times G_j + A_k + S_l(A_k) + R_m(S_l(A_k)) + e_{ijklmn} \quad (\text{Eq. 9})$$

Where  $y_{ijklmn}$  is the individual response expressed as  $\log_2 (E^{-Cq})$ ,  $\mu$  is the mean,  $T_i$  is the fixed effect of the tissue analysed ( $i=1$  LT,  $i=2$  ST,  $i=3$  MS,  $i=4$  SM,  $i=5$  SAT) or ( $i=1$  LT,  $i=2$  MS),  $G_j$  the fixed effect of the gene studied ( $j=3$ ; target gene, reference genes),  $A_k$  is the random effect of the  $k^{\text{th}}$  animal ( $A \sim N(0, \sigma^2_A)$ ).  $S_l(A_k)$  is the random effect of the  $l^{\text{th}}$  sample taken from the  $k^{\text{th}}$  animal ( $S \sim N(0, \sigma^2_S)$ );  $R_m(S_l(A_k))$  is the random effect of the  $m^{\text{th}}$  RT reaction of  $l^{\text{th}}$  sample from  $k^{\text{th}}$  animal ( $R \sim N(0, \sigma^2_R)$ ); and  $e_{ijklmn}$  is the residual random effect of each qPCR ( $e \sim N(0, \sigma^2_e)$ ).

#### 7.4. Variability analysis

An optimal experimental design requires to know the sources of error throughout sample processing. This question was addressed by a variability analysis to study the contribution of factors that affect the total variance of the experiment. The RT-qPCR results were analysed by the NESTED procedure (SAS 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) following the experimental design defined that included the animal (A) and the following steps of the analytical process: sampling or RNA extraction (S), reverse transcription (RT) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR). For RNA extraction, three sub-samples were taken from the muscles and SAT at slaughter. Then, as described, from each RNA extraction sample (S) two RT were performed and finally for each RT two qPCR replicates were run following the nested design described below in Eq 10:

$$[(nA=4) \times (nS=3) \times (nRT=2) \times (nqPCR=2)] \quad (\text{Eq. 10})$$

The laboratory analyses (RNA extraction, RT and qPCR) were completely randomized in order to minimize the experimental variability. This design allows the quantification of the variability due to RNA extraction, RT and qPCR in gene expression of the genes of interest.

For each tissue ( $i$ ) and each gen ( $j$ ), data were analysed using the following model (Eq. 11):

$$y_{ijklmn} = \mu + A_k + S_l(A_k) + R_m(S_l(A_k)) + e_{ijklmn} \quad (\text{Eq. 11})$$

Where,  $y_{ijklmn}$  is the individual response expressed as Cq.  $A_k$  is the random effect of the  $k^{\text{th}}$  animal ( $A \sim N(0, \sigma_A^2)$ ).  $S_l(A_k)$  is the random effect of the  $l^{\text{th}}$  sample taken from the  $k^{\text{th}}$  animal ( $S \sim N(0, \sigma_S^2)$ );  $R_m(S_l(A_k))$  is the random effect of the  $m^{\text{th}}$  RT reaction of  $l^{\text{th}}$  sample from  $k^{\text{th}}$  animal ( $R \sim N(0, \sigma_R^2)$ ); and  $e_{ijklmn}$  is the residual random effect of each qPCR ( $e \sim N(0, \sigma_e^2)$ ).

The variance contributions of the processing steps were estimated as follows in Eq. 12:

$$\hat{\sigma}_{ct}^2 = \hat{\sigma}_k^2 + \hat{\sigma}_l^2 + \hat{\sigma}_m^2 + \hat{\sigma}_n^2 \quad (\text{Eq. 12})$$

Variance contributions were also expressed as percentages (Eq. 13):



$$\text{Variance contribution} = 100 \times \hat{\sigma}_x^2 / \hat{\sigma}_{ct}^2 \quad (\text{Eq. 13})$$

Where  $x = k, l, m$  or  $n$  (animal, sample, RT and qPCR respectively).

## 8. REFERENCES

- Albertí P, Gomez I, Mendizábal JA, Ripoll G, Barahona M, Sarries V, *et al.* Effect of whole linseed and rumen-protected conjugated linoleic acid enriched diets on feedlot performance, carcass characteristics, and adipose tissue development in young Holstein bulls. *Meat Sci.* 2013;94(2): 208-214. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.01.015.
- Alfonso L, Mendizábal JA. Caracterización de la distribución del tamaño de los adipocitos para el estudio del tejido adiposo en producción animal. *ITEA.* 2016;112(2): 147-161.
- Andersen C.L, Jensen J.L, Falck Ørntoft T. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Set. *Cancer research.* 2004. 64, 5245–5250
- Bergman I, Loxley R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Chem.* 1963;35(12): 1961-1965.
- Bonnet M, Bernard L, Bes S, Leroux C. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalisation in adipose tissue, muscle, liver and mammary gland from ruminants. *Animal : an international journal of animal bioscience.* 2013;7(8):1344-53. doi: 10.1017/S1751731113000475.
- Bonnet, M., and Kopp, J. Dosage du collagène dans les tissus conjonctifs de la viande et les produits carne ´ s. *Viandes Prod. Carne ´ s.* 1986. 7(6), 263–266.
- Council Directive 2008/119/EC of 18 December 2008 laying down minimum standards for the protection of calves. In *OJ L 10*, editor. 2009. p. 7–13.
- Council Regulation (EC) No 1/2005 on the protection of animals during transport and related operations. In *OJ L 3* editor. 2005. p. 1–44.
- Duarte MS, Paulino PV, Das AK, Wei S, Seroo NV, Fu X, *et al.* Enhancement of adipogenesis and fibrogenesis in skeletal muscle of Wagyu compared with Angus cattle. *J. Anim. Sci.* 2013;91(6): 2938-2946. doi: 10.2527/jas.2012-5892.
- Freeman JB, Dale R. Assessing bimodality to detect the presence of a dual cognitive process. *Behav. Res. Methods.* 2013;45(1): 83-97.
- Hartigan JA, Hartigan P. The dip test of unimodality. *Ann. Stat.* 1985: 70-84.
- Hood RL, Allen CE. Cellularity of bovine adipose tissue. *J Lipid Res.* 1973;14(6):605-10.
- Jo J, Shreif Z, Periwal V. Quantitative dynamics of adipose cells. *Adipocyte.* 2012;1(2):80-8. 10.4161/adip.19705.

- Kjeldahl J. Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern. Fresenius J. Anal. Chem. 1883;22(1): 366-382.
- McLaughlin T, Sherman A, Tsao P, Gonzalez O, Yee G, Lamendola C, *et al.* Enhanced proportion of small adipose cells in insulin-resistant vs insulin-sensitive obese individuals implicates impaired adipogenesis. *Diabetologia*. 2007;50(8): 1707-1015. doi: 10.1007/s00125-007-0708-y.
- Pfaffl M.W, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlation. *Biotechnology Letters*. 2004 26: 509–515.
- Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. *J. Biol. Chem.* 1964; 239: 375-380.
- Silver N, Best S, Jiang J, Thein S.L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular biology*. 2006. 7:33. doi:10.1186/1471-2199-7-33.
- Soret B, Mendizabal JA, Arana A, Alfonso L. Expression of genes involved in adipogenesis and lipid metabolism in subcutaneous adipose tissue and longissimus muscle in low-marbled Pirenaica beef cattle. *Animal*. 2016;10(12): 2018-2026. doi: 10.1017/S175173111600118X.
- Steibel JP, Poletto R, Coussens PM, Rosa GJ. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics*. 2009;94(2): 146-152. doi: 10.1016/j.ygeno.2009.04.008.
- Union E. Council Regulation (EC) No. 1099/2009 of September 24th 2009 on the Protection of Animals at the Time of Killing. *Off Journal of European Union*; 2009. p. 1-30.
- Union E. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of September 22th 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes. In: Union OJ E, editor. 2010. p. 33-79.
- Urrutia O, Mendizábal JA, Insausti K, Soret B, Purroy A, Arana A. Effects of addition of linseed and marine algae to the diet on adipose tissue development, fatty acid profile, lipogenic gene expression, and meat quality in lambs. *PLoS One*. 2016;11(6): e0156765. doi:10.1371/journal.pone.0156765.
- Vandesompele J, De Preter J, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 2002. 3(7):research0034.1–0034.11
- Waters SM, Kenny DA, Killeen AP, Spellman SA, Fitzgerald A, Hennessy AA, *et al.* Effect of level of eicosapentaenoic acid on the transcriptional regulation of Delta-9 desaturase using a novel in vitro bovine intramuscular adipocyte cell culture model. *Animal* 2009; 3(5):718-27. doi: 10.1017/S1751731109004054.

**CHAPTER 5: STUDY I**

**ADIPOSITY AND ADIPOGENIC GENE EXPRESSION IN FOUR DIFFERENT  
MUSCLES IN BEEF CATTLE**



## 1. INTRODUCTION

It is well established that muscles display differences in muscle fiber type, proteolytic activity, connective tissue and intramuscular fat (IMF) percentage, attributes that are related to the molecular, metabolic, structural, and contractile properties of the muscle (Oddy *et al.*, 2001; Moreno-Sanchez *et al.*, 2010). The former characteristics have a deep influence on meat quality traits as well (Dai *et al.*, 2009). IMF plays an essential role in the determination of meat quality and it is acknowledged as an economically important feature (Smith *et al.*, 2009; Hocquette *et al.*, 2010). In some cases, quality of meat can be compromised by the low tendency of some cattle populations to accumulate IMF. This is the case of Pirenaica breed for example, which is widely used in northern Spain and is highly appreciated for its value as a genetic resource and its contribution to the maintenance of local beef production systems (Soret *et al.*, 2016). Different approaches have been considered with the objective of increasing Pirenaica IMF content, as extending the fattening period from 12 months of age (the usual endpoint) to 18 and increasing the feed energy density, but neither seem to have a significant effect on the amount of IMF in the *longissimus* muscle as shown in a previous study (Soret *et al.*, 2016). Then, deepening the knowledge of IMF accretion mechanisms would be important to find appropriate strategies to increase the value of the meat produced in these systems.

Most of the studies performed in cattle up to date have focused on evaluating the influence of external factors like breed, age and diet in the *longissimus thoracis* muscle. Nevertheless, studying just the *longissimus* muscle might be limiting as the different anatomical regions and divergent functionalities of muscles can be related to differences in fat accretion and metabolism (Costa *et al.*, 2007; Hocquette *et al.*, 2010). This in turn could be associated to differential expression of key genes involved in the IMF deposition and development. Furthermore, some experimental designs that require a high sampling size might not be affordable due to the high commercial value of *longissimus* muscle. Therefore, it would be of interest to analyze the potential differences between different muscles when studying the mechanisms that regulate IMF accretion in cattle.

Real time reverse transcription PCR (RT-qPCR) allows quantification of the changes in gene expression (Pfaffl *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2010; Jacob *et al.*, 2013) and can be a useful technique to gain knowledge about the IMF deposition process. However, a wide range of analytical situations, apart from the animal, the tissue or the experimental treatment assayed, may affect gene expression (Steibel *et al.*, 2009). In order to improve the experimental designs and to achieve a more accurate analysis of the experimental hypothesis it is of interest to analyze the different analytical factors that affect RT-qPCR results (Tichopad *et al.*, 2009).

The first objective of this study was to assess the possible differences in fat, and protein content as well as in adipocyte size distribution of different muscles and to determine if the expression of some key adipogenic genes was muscle and depot dependent. The muscles selected for the study were: *longissimus thoracis* (LT), *semitendinosus* (ST), *masseter* (MS), and *sternomandibularis* (SM). The criteria for muscle selection were the dominant metabolism, being either predominantly glycolytic (LT and ST) (Hwang *et al.*, 2010; Listrat *et al.*, 2016; Robelin *et al.*, 1993) or predominantly oxidative (MS and SM) (Devine *et al.*, 1984; Totland *et al.*, 1991; Picard *et al.*, 1996;), and their commercial value (Torrescano *et al.*, 2003; Tume *et al.*, 2010). In order to study the effect of depot on the adipogenic gene expression, and to take as reference a widely studied tissue, subcutaneous adipose tissue (SAT) from the *longissimus* area was also considered (Smith *et al.*, 1998; Schoomaker *et al.*, 2004). The second aim was to study the main sources of experimental variability associated with gene expression in order to implement appropriate experimental designs that could allow to minimize the experimental variability.

## 2. RESULTS

### 2.1 Chemical traits

Chemical fat content was higher in MS and SM compared to LT and ST muscles ( $P < 0.05$ ) but no statistically significant differences were found in the protein content and moisture among muscles (Table 5.1).

**Table 5.1.** Mean values and mean standard errors for the chemical traits measured in *longissimus thoracis*, *semitendinosus*, *masseter*, and *sternomandibularis* muscles.

	<i>LT</i> <sup>1</sup>	<i>ST</i>	<i>MS</i>	<i>SM</i>	SEM	<i>P</i> -value
Fat, %	1.30 <sup>b</sup>	1.34 <sup>b</sup>	3.22 <sup>a</sup>	3.15 <sup>a</sup>	0.30	0.005
Protein, %	22.16	21.59	20.75	21.02	0.39	0.112
Moisture	74.52	75.27	75.49	76.17	0.31	0.335

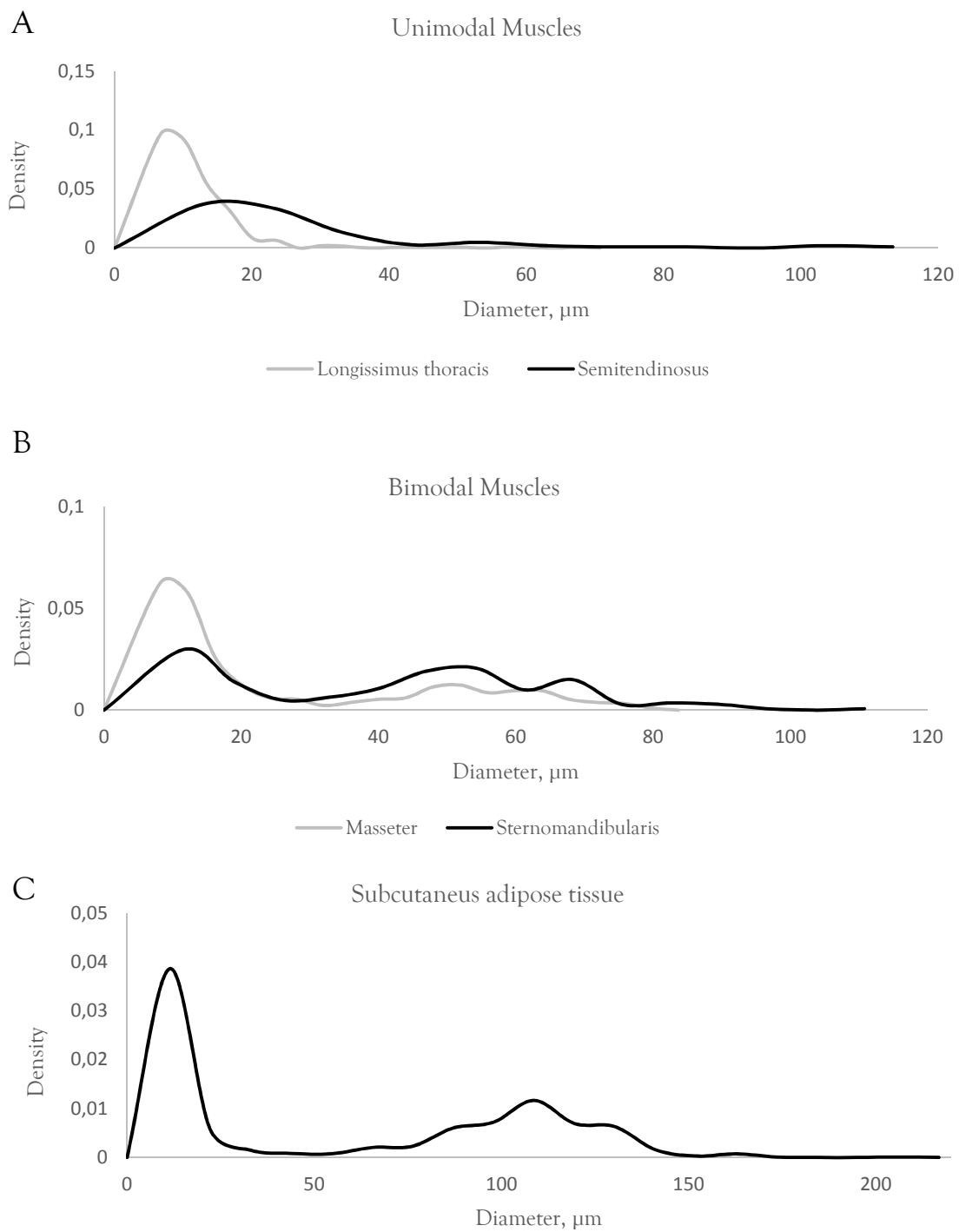
<sup>1</sup>*LT*= *Longissimus thoracis*, *ST*= *Semitendinosus*; *MS*= *Masseter*; *SM*= *Sternomandibularis*

<sup>a,b</sup>Means with different superscripts within a row are different ( $P < 0.05$ ).

## 2.2 Adipocyte size analysis

According to the unimodality-bimodality study based on BC and Dip tests, muscles presented different adipocyte size distributions. Adipocytes from *LT* and *ST* muscles had a unimodal distribution while the adipocytes from *MS* and *SM* muscles showed a bimodal distribution. The cell size distribution for adipocytes obtained from the SAT was also bimodal (Figure 5.1).

It was observed that the minimum, mean, mode ( $P < 0.05$ ) and median ( $P \leq 0.001$ ) of the adipocytes were significantly smaller in *LT* than in *ST* muscles (Table 5.2), both with unimodal adipocyte size distribution. Regarding the tissues that showed a bimodal adipocyte size distribution (*MS*, *SM*, and SAT), the minimum adipocyte size was significantly lower in SAT compared to *SM* muscle ( $P < 0.05$ ) (Table 5.3) while the maximum adipocyte size was similar between both muscles and greater in SAT ( $P < 0.05$ ). The first mode was significantly lower in *MS* compared to *SM* muscle ( $P < 0.05$ ) and was similar between SAT and both muscles. The second mode was significantly lower in *MS* and *SM* muscles than in SAT ( $P < 0.001$ ). On the other hand, the nadir, the percentage above the nadir and the small/large ratio, showed no significant differences between tissues.



**Figure 5.1.** Adipocyte size distribution of the tissues studied. A) adipocyte size distribution in the muscles *longissimus thoracis* and *semitendinosus*; B) adipocyte size distribution in the muscles *masseter* and *sternomandibularis*; C) adipocyte size distribution in the subcutaneous adipose tissue.



**Table 5.2.** Descriptive parameters for adipocyte size distribution in *longissimus thoracis* and *semitendinosus* muscles.

Unimodal distribution				
Item	<i>LT</i> <sup>1</sup>	<i>ST</i>	SEM	<i>P</i> -value
Minimum, $\mu\text{m}$	5.68	9.80	0.63	0.005
Maximum, $\mu\text{m}$	48.78	66.22	13.26	0.404
Median, $\mu\text{m}$	10.11	21.40	0.82	0.001
Mean, $\mu\text{m}$	13.25	26.79	2.63	0.013
Mode, $\mu\text{m}$	10.35	17.45	1.51	0.019

<sup>1</sup>*LT*= *Longissimus thoracis*, *ST*= *Semitendinosus*

**Table 5.3.** Descriptive parameters for adipocyte size distribution in *masseter*, *sternomandibularis* muscles, and subcutaneous adipose tissue.

Bimodal distribution					
Item	<i>MS</i> <sup>1</sup>	<i>SM</i>	SAT	SEM	<i>P</i> -value
Minimum, $\mu\text{m}$	7.25 <sup>ab</sup>	10.29 <sup>a</sup>	6.89 <sup>b</sup>	0.79	0.026
Maximum, $\mu\text{m}$	69.5 <sup>b</sup>	89.62 <sup>b</sup>	163.61 <sup>a</sup>	9.73	0.001
Nadir, $\mu\text{m}$	27.07	34.97	38.90	3.15	0.126
% above the nadir	35.62	55.87	48.55	6.25	0.148
Small/large	1.97	0.93	1.12	0.30	0.091
First mode, $\mu\text{m}$	10.68 <sup>b</sup>	18.39 <sup>a</sup>	12.61 <sup>ab</sup>	1.58	0.029
Second mode, $\mu\text{m}$	55.26 <sup>b</sup>	59.04 <sup>b</sup>	113.95 <sup>a</sup>	4.96	0.000

<sup>1</sup>*MS*= *Masseter*; *SM*= *Sternomandibularis*; SAT= subcutaneous adipose tissue

<sup>a,b</sup> Means with different superscripts within a row are different ( $P < 0.05$ ).

### 2.3. Gene expression

To determine if there were differences in the gene expression between tissues, a MIXED model was used to compare the different tissues one by one.

No differences were found between muscles for *PPARG*, *CEBPA* and *WNT10B* expression (Table 5.4). The expression of *FABP4* was significantly higher in *LT* muscle compared to *MS* ( $P < 0.05$ ) and *SM* ( $P < 0.001$ ).

**Table 5.4.** Differences in normalized expression values between muscles *longissimus thoracis*, *semitendinosus*, *masseter* and *sternomandibularis*

Gene	Contrast	DIF <sup>3</sup>	SEM	P-value
<i>PPARG</i> <sup>1</sup>	<i>LT-MS</i> <sup>2</sup>	0.53	0.42	0.215
	<i>LT-ST</i>	0.43	0.78	0.584
	<i>LT-SM</i>	1.01	0.53	0.061
	<i>MS-ST</i>	-0.09	0.78	0.907
	<i>MS-SM</i>	0.49	0.53	0.358
	<i>ST-SM</i>	0.58	0.85	0.501
<i>CEBPA</i>	<i>LT-MS</i>	0.42	0.46	0.361
	<i>LT-ST</i>	-0.15	0.74	0.839
	<i>LT-SM</i>	-0.03	0.45	0.939
	<i>MS-ST</i>	-0.54	0.81	0.507
	<i>MS-SM</i>	-0.45	0.49	0.363
	<i>ST-SM</i>	0.07	0.81	0.930
<i>FABP4</i>	<i>LT-MS</i>	1.36	0.57	0.020
	<i>LT-ST</i>	1.16	1.31	0.379
	<i>LT-SM</i>	2.24	0.67	0.001
	<i>MS-ST</i>	-0.19	1.25	0.879

	MS-SM	0.88	0.59	0.139
	ST-SM	1.08	1.32	0.416
WNT10B	LT-MS	-0.32	0.62	0.606
	LT-ST	-0.42	0.80	0.604
	LT-SM	-1.13	0.64	0.082
	MS-ST	-0.10	0.70	0.886
	MS-SM	-0.82	0.54	0.137
	ST-SM	-0.72	0.77	0.351

<sup>1</sup>PPARG = peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; CEBPA = CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$ ; FABP4 = fatty acid binding protein 4; WNT10B = wingless-type MMTV integration site family 10B.

<sup>2</sup>LT= *Longissimus thoracis*, ST= *Semitendinosus*; MS= *Masseter*; and SM= *Sternomandibularis*

<sup>3</sup>DIF = contrasted differences between normalised  $\log_2$  ( $E^{-Cq}$ ) values.

The expression of the genes of interest in the four muscles studied was also compared to their expression in the SAT (Table 5.5). PPARG, CEBPA and FABP4 expression was significantly higher in the SAT than in the muscles ( $P < 0.01$ ), but WNT10B expression did not show any differences between depots ( $P > 0.05$ ).

**Table 5.5.** Differences in normalized expression values between *longissimus thoracis*, *semitendinosus*, *masseter*, *sternomandibularis*, and subcutaneous adipose tissue.

Gene	Contrast	DIF <sup>3</sup>	SEM	Pvalue
PPARG <sup>1</sup>	SAT-LT <sup>2</sup>	2.07	0.52	0.000
	SAT-MS	2.56	0.48	0.000
	SAT-ST	2.51	0.76	0.002
	SAT-SM	3.07	0.51	0.000
CEBPA	SAT-LT	3.50	0.52	0.000
	SAT-MS	3.87	0.54	0.000
	SAT-ST	3.38	0.80	0.000

	SAT-SM	3.45	0.49	0.000
FABP4	SAT-LT	7.48	0.60	0.000
	SAT-MS	8.82	0.47	0.000
	SAT-ST	8.68	1.25	0.000
	SAT-SM	9.75	0.56	0.000
WNT10B	SAT-LT	0.51	0.56	0.368
	SAT-MS	0.12	0.39	0.762
	SAT-ST	0.11	0.66	0.664
	SAT-SM	-0.67	0.48	0.168

<sup>1</sup> PPARG = peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; CEBPA = CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$ ; FABP4 = fatty acid binding protein 4; WNT10B = wingless-type MMTV integration site family 10B.

<sup>2</sup>LT= *Longissimus thoracis*, ST= *Semitendinosus*; MS= *Masseter*; and SM= *Sternomandibularis*; SAT= subcutaneous adipose tissue.

<sup>3</sup>DIF = contrasted differences between normalised  $\log_2$  ( $E^{-Cq}$ ) values.

#### 2.4. Variability analysis

There were a total of 48 readings (Cqs) for each of the genes studied in the four muscles and the SAT; those data were analyzed as specified by the nested design (4 animals x 3 samples per tissue x 2 RTs x 2 qPCRs) in order to estimate the contribution of the main sources of variability to the total variation. Mean, minimum, maximum and coefficient of variation (CV) of Cqs obtained for each gene and estimated standard deviations of the different factors that affect to the experiment and total variance are shown in Tables 5.6-5.8. The contribution of the processing steps to the variance was also expressed as percentages to facilitate the comprehension of the results (Figure 3).

The genes *PPARG*, *CEBPA*, and *FABP4*, had Cq values that ranged from 26 to 29 cycles in the four muscles studied, whereas the reference genes, *ACTB* and *TOP2B*, ranged from 22 to 25. *WNT10B* had the lower expression and ranged from 31 to 32 cycles in the muscles. In a similar way, in the SAT the expression of *PPARG*, *CEBPA* and *FABP4* was higher than the expression of *WNT10B*. For all genes, CV values were below 10%

except for FABP4 (15.9%) and ACTB (10.5%) in ST muscle (Tables 5.6 and 5.7 respectively).

Referring to the variance contributions of the processing steps, the results showed that, in general, the RT represented the higher percentage of the total variance followed by the sampling. The standard deviation average values obtained for the sampling and RT steps in the four muscles studied were 34% and 39% respectively and the sum of both represented in average, the 73% of the total variance. On the contrary, qPCR variance was low in most of cases. The muscle *ST* presented the higher total variability, which was associated with the sampling as source of variation. The factor “animal” expressed higher variability in the SAT than in the muscles.

**Table 5.6.** Mean, minimum, maximum and coefficient of variation (CV) of Cq values and estimated standard deviations for inter-animal variation, processing steps (Sampling, RT and qPCR) and total variance in muscles *longissimus thoracis*, *semitendinosus*, *masseter* and *sternomandibularis* for adipogenic markers.

Item	<i>LT</i>				<i>ST</i>				<i>MS</i>				<i>SM</i>			
	PPARG <sup>2</sup>	CEBPA	FABP4	WNT10B	PPARG	CEBPA	FABP4	WNT10B	PPARG	CEBPA	FABP4	WNT10B	PPARG	CEBPA	FABP4	WNT10B
Mean Cq	26.43	28.90	25.63	32.20	27.34	29.26	27.33	32.29	26.38	28.79	26.46	31.34	27.61	28.99	28.15	31.09
Minimum Cq	23.64	26.21	20.89	29.08	23.09	24.54	17.98	28.62	25.06	25.70	24.11	28.22	25.76	27.17	24.65	28.75
Maximum Cq	28.56	30.91	29.69	39.44	32.69	34.36	34.55	36.35	28.50	31.09	29.91	33.35	30.45	30.84	31.00	35.04
CV (%)	3.87	2.94	7.01	6.89	8.09	7.82	15.94	5.64	3.53	4.15	4.44	3.87	4.65	2.86	5.57	4.66
$\hat{\sigma}$																
Animal	0.40	0.31	0.00	0.28	1.03	1.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.43	0.00	0.80	0.28	0.00	0.66
Sampling	0.49	0.37	1.51	0.69	1.69	1.54	3.92	1.34	0.77	1.05	0.57	0.87	0.42	0.05	1.28	0.71
RT	0.53	0.50	0.96	1.64	0.81	1.25	1.63	0.78	0.54	0.63	0.47	0.54	0.94	0.67	0.54	0.85
qPCR	0.62	0.48	0.54	1.08	0.74	0.41	0.80	0.85	0.29	0.48	0.76	0.56	0.27	0.37	0.70	0.57
Total	1.03	0.84	1.87	2.10	2.26	2.31	4.32	1.77	0.99	1.31	1.14	1.17	1.33	0.82	1.56	1.41

<sup>1</sup>LT= *Longissimus thoracis*, ST= *Semitendinosus*; MS= *Masseter*; and SM= *Sternomandibularis*

<sup>2</sup>PPARG = *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ; CEBPA = *CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$* ; FABP4 = *fatty acid binding protein 4*; WNT10B = *wingless-type MMTV integration site family 10B*.

**Table 5.7.** Mean, minimum, maximum and coefficient of variation (CV) of Cq values, estimated standard deviations for inter-animal variation, processing steps (Sampling, RT and qPCR) and total variance in muscles *longissimus thoracis*, *semitendinosus*, *masseter* and *sternomandibularis* for reference genes.

Item	<i>LT</i> <sup>1</sup>		<i>ST</i>		<i>MS</i>		<i>SM</i>	
	<i>ACTB</i> <sup>2</sup>	<i>TOP2B</i>	<i>ACTB</i>	<i>TOP2B</i>	<i>ACTB</i>	<i>TOP2B</i>	<i>ACTB</i>	<i>TOP2B</i>
Mean Cq	22.93	24.32	23.26	24.76	22.12	23.90	22.78	24.71
Minimum Cq	20.13	22.22	19.67	21.91	19.98	21.87	20.51	22.50
Maximum Cq	26.27	28.08	29.94	30.90	24.82	27.74	27.08	28.27
CV (%)	7.06	6.09	10.46	8.91	5.91	5.86	7.44	6.87
$\hat{\sigma}$								
Animal	0.00	0.22	1.35	1.04	0.00	0.00	0.00	0.74
Sampling	0.80	0.60	1.36	1.62	0.72	0.00	0.89	1.08
RT	1.45	1.27	1.83	1.00	1.10	1.49	1.28	1.17
qPCR	0.72	0.48	0.56	0.78	0.52	0.22	0.34	0.19
Total	1.80	1.50	2.71	2.30	1.41	1.51	1.59	1.76

<sup>1</sup>*LT*= *Longissimus thoracis*, *ST*= *Semitendinosus*; *MS*= *Masseter*; and *SM*= *Sternomandibularis*

<sup>2</sup>*ACTB* =  $\beta$ -actin; *TOP2B* = *Topoisomerase II-beta*.

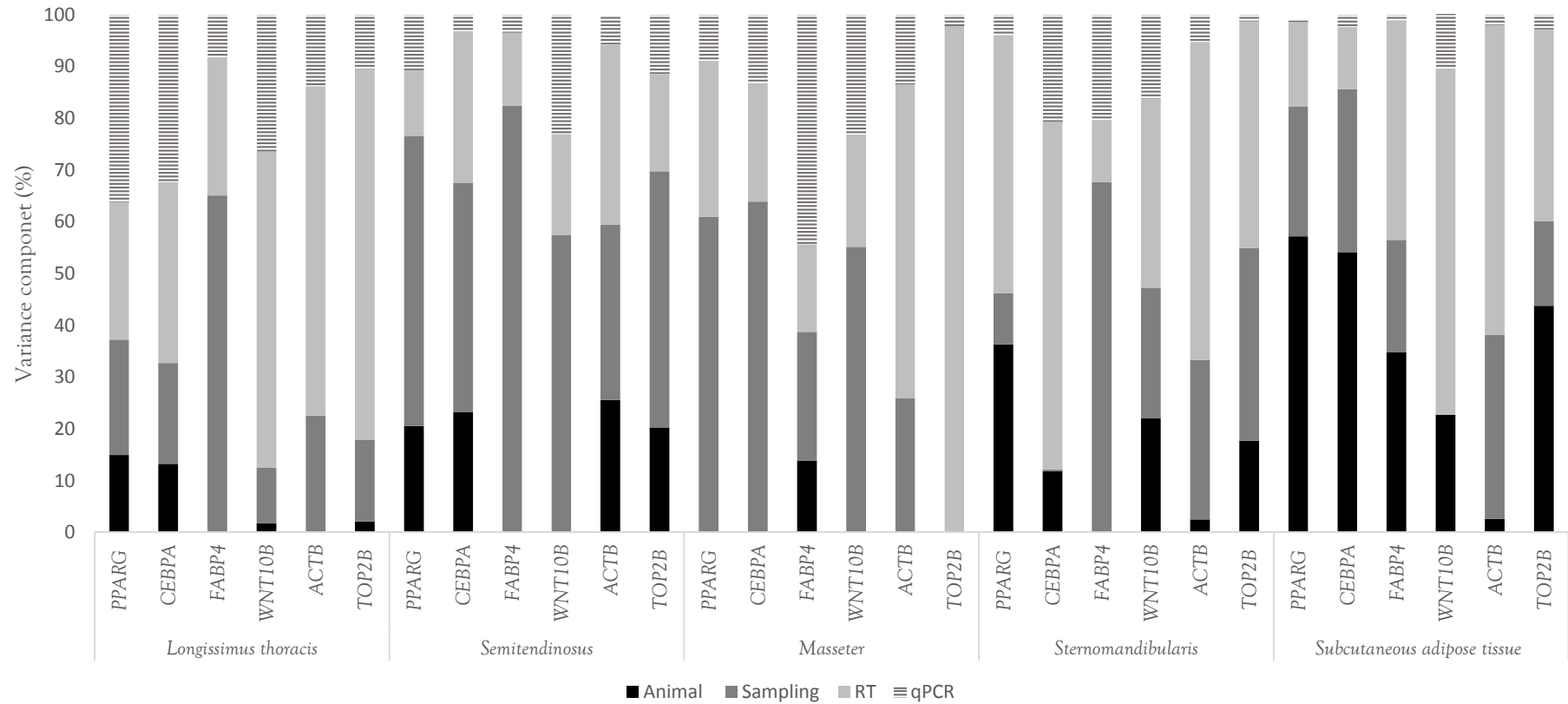
**Table 5.8.** Mean, minimum, maximum and coefficient of variation (CV) of Cq values, estimated standard deviations for inter-animal variation, processing steps (Sampling, RT and qPCR) and total variance in subcutaneous adipose tissue.

Item	SAT <sup>1</sup>					
	PPARG <sup>2</sup>	CEBPA	FABP4	WNT10B	ACTB	TOP2B
Mean Cq	23.31	24.31	16.66	30.74	20.89	24.14
Minimum Cq	21.21	21.56	14.72	29.19	18.95	22.93
Maximum Cq	26.42	28.16	19.25	32.40	23.07	25.94
CV (%)	5.92	5.98	7.12	2.47	4.72	3.15
$\hat{\sigma}$						
Animal	1.11	1.12	0.70	0.40	0.15	0.54
Sampling	0.73	0.85	0.55	0.00	0.54	0.33
RT	0.59	0.53	0.77	0.69	0.70	0.49
qPCR	0.10	0.23	0.12	0.28	0.13	0.14
Total	1.47	1.52	1.19	0.84	0.91	0.81

<sup>1</sup>SAT= subcutaneous adipose tissue

<sup>2</sup>PPARG = peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; CEBPA = CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$ ; FABP4 = fatty acid binding protein 4; WNT10B = wingless-type MMTV integration site family 10B; ACTB =  $\beta$ -actin; TOP2B = Topoisomerase II- beta





**Figure 5.3.** Standard deviations contributing for the sampling-processing steps expressed as percentages. *PPARG* = *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ; *CEBPA* = *CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$* ; *FABP4* = *fatty acid binding protein 4*; *WNT10B*= *wingless-type MMTV integration site family 10B*; *ACTB* =  *$\beta$ -actin* *TOP2B* = *Topoisomerase II-beta*

### 3. DISCUSSION

It is widely accepted that IMF is an attribute of economic importance as it influences meat quality. In cattle, IMF content varies greatly between breeds but it also differs within animals and muscles (Jeremiah *et al.*, 2003). There are several factors involved in this variability, from rearing conditions, such as feeding (Renand *et al.*, 2003) or age endpoint, to the relative importance of oxidative and glycolytic metabolism in muscle fibers (Hocquette *et al.*, 2000). Then, studying different muscles could improve the understanding of the IMF development and the factors involved in its accumulation. Therefore, the main objective of this work was to analyze potential differences between different bovine muscles in terms of IMF, and protein content, adipocyte size distribution and gene expression of different key genes involved in the IMF accretion.

Adipose tissue deposition is attributed to either an increase of adipocyte number (hyperplasia), adipocyte volume (hypertrophy) or a combination of both (Hood and Allen, 1973; Cianzio *et al.*, 1982; Jo *et al.*, 2009). Intensity of hyperplasia and hypertrophy processes are influenced by factors such as genotype, sex, age, feeding regimen, and the individual adipose tissue depot (Hood and Allen, 1973; Cianzio *et al.*, 1982; Vernon, 1986). Then, the study of the size and number of adipocytes might help to elucidate the different contribution of hypertrophy and hyperplasia of adipose cells to lipid accumulation (Alzon *et al.*, 2007) and therefore, to better understand the relationship between those processes and the amount of fat stored in the tissues.

In the current work, adipocytes from MS and SM muscles, as well as from the SAT, showed a bimodal distribution (Table 5.3) typically observed for the adipose tissue (McLaughlin *et al.*, 2007; Soula *et al.*, 2013), and characterized for having a small and a large adipocyte population. On the contrary, in LT and ST muscles a unique adipocyte population of adipocytes, presenting a unimodal size distribution, was observed (Table 5.2). That difference might be related to the different development stages that can be found in the various adipose tissue depots at a fixed point during the growing process of the animals (Eguinoa *et al.*, 2003). From a developmental point of view, IMF is the less mature and the last adipose tissue depot to accumulate fat, and the SAT develops earlier (Hood and Allen, 1973; Sainz *et al.*, 2000), fact that has been observed for various

species such as finishing pigs, sheep and cattle (Hauser *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000; Harper *et al.*, 2004). Similarly to the fact that different adipose depots develop at different rates, (Du *et al.*, 2000) it might be as well that there is a variability in the rate of IMF accretion between muscles, showing different fat development rates. This agrees with the findings by Roberts *et al.* (2015) who indicated that within a single animal not all intramuscular deposits are at the same stage of development. The greater amount of IMF and the bimodal adipocyte size distribution displayed by the MS and SM muscles could indicate a more active hypertrophy process than in the LT and ST muscles. A delay in adipocyte hypertrophy can be associated with a lower maturity or delayed fat deposition (Bonnet *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2015).

Therefore, the results suggest that the IMF develops later in LT and ST than in the other two muscles studied in the current work, resulting in a delay in the fat deposition in those muscles, as corroborated by the greater amount of fat in MS and SM muscles.

On the other hand, as mentioned above, the amount of fat can be influenced as well by the type of fiber. Then the greater amount of IMF content observed in MS and SM muscles compared to LT and ST (Table 5.1) could be related to a higher proportion of oxidative fibers, which contain more phospholipids and triglycerides (Hocquette *et al.*, 2010).

In order to investigate if the differences found in the IMF content and the adipocyte size distribution were related to adipocyte differentiation and fatty acid metabolism, the expression of some key adipogenic genes (*PPARG*, *CEBPA*, *FABP4* and *WNT10B*) was analyzed in the four muscles.

*PPARG* and *CEBPA* are central regulators of adipogenesis and act together in the last stages of the adipocyte differentiation program as pleiotropic transcriptional activators of the large group of genes that produce the adipocyte phenotype (MacDougald *et al.*, 1995; Schwarz *et al.*, 1997; Rosen *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2012). The expression of *PPARG* and *CEBPA* have been related to IMF content in cattle in previous works and a positive relationship between the expression of these genes and the amount of fat has been found (Du *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2013). Other studies nevertheless did not show such relationship (Martins *et al.*, 2015; Pickworth *et al.*, 2015).

In the present work, the differences in the IMF content and the cell size distribution displayed by the four muscles were not reflected by the gene expression of *PPARG* and *CEBPA* as no statistically significant differences between muscles were observed (Table 5.4). As mentioned above, other authors also found no concordance between the amount of fat in different adipose tissues and the expression of adipogenic genes such as *PPARG*. For instance, Pickworth *et al.* (2015) observed that Angus-Simmental crossbred steers differing in *longissimus dorsi* muscle fat percentage did not show differential *PPARG* expression. These authors hypothesized that the group of animals with the lower amount of IMF in the *longissimus* muscle had adipocytes undergoing differentiation whereas the other group might have had greater numbers of mature adipocytes, resulting in similar *PPARG* relative expression; they attributed the differences in intramuscular adipose tissue to differences in *PPARG* exhibited at an earlier stage of development.

The lack of differences in gene expression between muscles displaying different adipocyte size distributions and amount of IMF may be then related to the contribution to the total gene expression of the big adipocytes population in MS and SM muscles, considering that *PPARG* and *CEBPA* are also expressed in mature adipocytes (Wu *et al.*, 1999). Besides, Bennet *et al.* (2002) postulated that during adipogenesis and after day 3 of differentiation, expression of *CEBPA* and *PPARG* is self-supporting through positive feedback regulation, which might add to the results obtained.

The gene *FABP4* is mainly expressed in the adipocytes (Matarese *et al.*, 1988; Gerbens *et al.*, 1998) and encodes for proteins related to fatty acid uptake, transport and metabolism (Gregoire *et al.*, 1998), being involved in fat deposition (Thaller *et al.*, 2003; Michal *et al.*, 2006; Barendse *et al.*, 2009). In spite of young bulls at the end-point having a greater amount of IMF in MS and SM, and the fact that some observations showed increased *FABP4* expression as IMF developed (Pickworth *et al.*, 2015), those muscles had lower *FABP4* expression than *LT*. The reason for this result remains unknown but might be related to the involvement of *FABP4* in the long chain fatty acid accretion and the different nutrient partitioning between organs and tissues that could occur at different points of the development of animals. On the other hand, the accumulation

of FABP protein could be as well an indicator of adipocyte number within the muscle tissue (Hocquette *et al.*, 2003; Albrecht *et al.*, 2017) and then imply a higher number of adipose cells, albeit probably of smaller size, in LT muscle.

*WNT10B* is known to have a role in blocking adipogenesis, its expression is elevated in preadipocytes and declines upon induction of differentiation (Ross *et al.*, 2000; Bennett *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2012); it also seems to be involved in the inhibition of the IMF deposition (Luo *et al.*, 2009). Nevertheless, in the present work, and similarly to the case of *PPARG* and *CEBPA*, *WNT10B* gene expression did not present statistical differences between the muscles studied.

Taking into account the results obtained for the study of the gene expression in the four muscles, it was considered of interest to compare the IMF, a late developing adipose tissue, with another that develops early in the life of animals such as the SAT. Then, gene expression of the markers of interest was analyzed and a higher expression of *PPARG*, *CEBPA* and *FABP4* in the SAT than in the four muscles was observed (Table 5.5). On the contrary, *WNT10B* expression did not differ between muscles and SAT. Differences between IMF and SAT at the molecular level could be expected considering the different characteristics of both adipose depots. The differences found in the expression of *PPARG*, *CEBPA* and *FABP4* are in agreement with the SAT presenting bigger (Table 5.3), and possibly more adipocytes, than the muscles. Other studies also corroborated these differences between depots (Lee *et al.*, 2000; Pickworth *et al.*, 2015).

Regarding *WNT10B*, it was previously found that its expression was upregulated in the *longissimus* muscle in Pirenaica young bulls compared to the SAT (Soret *et al.*, 2016). Other authors observed that the expression of *WNT10B* was high in stromal vascular cells (which contains predominantly preadipocytes) and undetectable in mice primary adipocytes, which is consistent with the role of *WNT10B* in maintaining the preadipocytes in an undifferentiated state (Bennett *et al.*, 2002). Furthermore, when *WNT* signaling was prevented, preadipocytes underwent enhanced differentiation (Ross *et al.*, 2000). The results obtained in the present work might then be indicative of the presence of a population of cells in the pre-adipocyte state in the SAT.

It is known that gene expression data show a high variability, which reduces the ability to detect statistical significance. This fact can be overcome, to some extent, by an appropriate experiment design, which would take into account the preceding steps to the amplification by qPCR, and their contribution to the measurement error. In addition, confounding biological variation and analytical noise in a qPCR assay limit the ability to observe differential expression of treatment groups. Thus, a correct design that minimizes the variability is essential for a better interpretation of the data.

In the present work, the effects of the inter-animal variation and the processing noise of the analytical steps, which for animal tissues are the major factors that contribute to the variability in gene expression quantification, were evaluated. The contribution of the inter-animal variation to the total variance, that represents the biological variation among animals, was the lowest but it was also difficult to estimate with precision due to the small number of animals considered. In order to obtain a more representative results, and focusing on the sources of variability that can be controlled in the analytical steps, it has been highlighted the importance of taking more than a single sample per tissue (Cruz *et al.*, 2014). In addition, Tichopad *et al.* (2009) recommended the use of sample replicates preferentially to any other replicates when working with solid tissues. Based in those previous observations, the design of the present experiment included three different samples per tissue. The results obtained showed that the sampling and RT processing steps had the higher variability, explaining the highest CVs found and representing the 73% of the total variance. The final processing step was qPCR and its contribution to the total variance was consistently lower than the contribution of the other steps. Therefore, qPCR step showed the highest repeatability. The results obtained in the present study are in concordance with the conclusion reached by Tichopad *et al.* (2009). Then, the inclusion of sample and RT replicates in the design of future experiments is recommended preferentially to any other replicates in order to reduce the results variability, while the main reason to run qPCR replicates is to insure against a failed reaction so that the data point is not missed.

To summarize, the results obtained in the present work suggest that the different IMF accretion in the muscles studied might be related to different rates of hyperplasia and hypertrophy. In addition, IMF might develop later in *LT* and *ST* muscles, based on the

observations that MS and SM muscles had greater amount of IMF and adipocytes that followed a bimodal distribution while in the muscles LT and ST, with less IMF, the adipocyte size distribution was unimodal. That would agree with the fact that the more glycolytic muscle, eg. *Semitendinosus*, have lower levels of IMF (Hocquette *et al.*, 2003). Though, the differences in IMF amount and adipocyte size distribution were not mirrored by the expression of the adipogenic genes studied, result that might be related to the different rates of hyperplasia and hypertrophy and contribution of mature and non-mature adipocytes to the total expression of the genes. This was reinforced by the results obtained when studying the SAT, an early developing adipose depot that presents bigger adipocytes and higher number of adipose cells.

Animal and qPCR replicates are usually favored against sample and RT replicates in gene expression studies but the results obtained indicate that the latter are the analytical factors that add higher variability to the gene expression and accordingly, it would be appropriate to include sample and RT replicates in the design of future experiments. However, that implies experiments with bigger number of samples and analysis and, therefore a bigger economic cost. In this respect, and in order to reduce the high processing variability of the sampling and RT steps, various replicates of the samples can be taken and pooled for the RNA extraction, allowing then RT replicates. In the case of studies involving cattle, the substitution of the LT muscle by another of lower economic value might be suitable when studying gene expression. As previously said, the expression of the genes related to the IMF deposition (*PPARG*, *CEBPA*, and *WNT10B*) was similar between the muscles studied. Thus, MS and SM muscles, which had lower variability than ST and have a lower economic importance in relation to LT, could allow less expensive experimental designs and therefore bigger sample size that could permit the detection of lower relevant differences in gene expression.

#### 4. REFERENCES

- Albrecht E, Schering L, Liu Y, Komolka K, Kühn C, Wimmers K, *et al.* Triennial growth and development symposium: Factors influencing bovine intramuscular adipose tissue development and cellularity. *J. Anim. Sci.* 2017;95. doi:10.2527/jas2016.1036.

- Alzon M, Mendizabal JA, Arana A, Alberti P, Purroy A. Adipocyte cellularity in different adipose depots in bulls of seven Spanish breeds slaughtered at two body weights. *Animal*. 2007;1(2): 261-267. doi: 10.1017/S1751731107392744.
- Barendse W, Bunch RJ, Thomas MB, Harrison BE. A splice site single nucleotide polymorphism of the fatty acid binding protein 4 gene appears to be associated with intramuscular fat deposition in longissimus muscle in Australian cattle. *Anim. Genet*. 2009;40(5): 770-773. doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.01913.x.
- Bennett CN, Ross SE, Longo KA, Bajnok L, Hemati N, Johnson KW, *et al*. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J. Biol. Chem*. 2002;277(34): 30998-31004. doi: 10.1074/jbc.M204527200.
- Bonnet M, Cassar-Malek I, Chilliard Y, Picard B. Ontogenesis of muscle and adipose tissues and their interactions in ruminants and other species. *Animal*. 2010;4(7): 1093-109. doi: 10.1017/S1751731110000601.
- Cianzio DS, Topel DG, Whitehurst GB, Beitz DC, Self H. Adipose tissue growth in cattle representing two frame sizes: Distribution among depots. *J. Anim. Sci*. 1982;55(2): 305-312.
- Costa P, Roseiro LC, Bessa RJ, Padilha M, Partidario A, Marques de Almeida J, *et al*. Muscle fiber and fatty acid profiles of Mertolenga-PDO meat. *Meat Sci*. 2008;78(4): 502-512. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.07.020.
- Cruz GD, Wang Y, Fadel JG. Technical note: Alternatives to reduce adipose tissue sampling bias. *J. Anim. Sci*. 2014;92(10): 4761-4766. doi: 10.2527/jas.2014-8180.
- Dai F, Feng D, Cao Q, Ye H, Zhang C, Xia W, *et al*. Developmental differences in carcass, meat quality and muscle fibre characteristics between the Landrace and a Chinese native pig. *S. Afr. J. Anim. Sci*. 2009;39(4): 267-273.
- Devine CE, Ellery S, Averill S. Responses of different types of ox muscle to electrical stimulation. *Meat Sci*. 1984;10(1):35-51. doi: 10.1016/0309-1740(84)90030-5.
- Du M, Huang Y, Das A, Yang Q, Duarte M, Dodson M, *et al*. Manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. *J. Anim. Sci*. 2013;91: 1419-1427.
- Duarte MS, Paulino PV, Das AK, Wei S, Seroo NV, Fu X, *et al*. Enhancement of adipogenesis and fibrogenesis in skeletal muscle of Wagyu compared with Angus cattle. *J. Anim. Sci*. 2013;91(6): 2938-2946. doi: 10.2527/jas.2012-5892.
- Eguinoa P, Brocklehurst S, Arana A, Mendizabal JA, Vernon RG, Purroy A. Lipogenic enzyme activities in different adipose depots of Pirenaican and Holstein bulls and heifers taking into account adipocyte size. *J. Anim. Sci*. 2003;81(2): 432-440.
- Gerbens F, Jansen A, van Erp AJ, Harders F, Meuwissen TH, Rettenberger G, *et al*. The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pigs. *Mamm. Genome*. 1998;9(12): 1022-1026.



- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 1998;78(3): 783-809.
- Harper G, Pethick D. How might marbling begin? *Anim. Prod. Sci.* 2004;44(7): 653-662.
- Hauser N, Mourot J, De Clercq L, Genart C, Remacle C. The cellularity of developing adipose tissues in Pietrain and Meishan pigs. *Reprod. Nutr. Dev.* 1997;37(6): 617-625.
- Hocquette J, Jurie C, Ueda Y, Boulesteix P, Bauchart D, Pethick D. The relationship between muscle metabolic pathways and marbling of beef. *EAAP. publ.* 2003;109: 513-516.
- Hocquette J, Ortigues-Marty I, Damon M, Herpin P, Geay Y. Métabolisme énergétique des muscles squelettiques chez les animaux producteurs de viande. *INRA Prod. Anim.* 2000;13(3): 185-200.
- Hocquette JF, Gondret F, Baeza E, Medale F, Jurie C, Pethick DW. Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal.* 2010;4(2): 303-319. doi: 10.1017/S1751731109991091.
- Hood RL, Allen CE. Cellularity of bovine adipose tissue. *J. Lipid Res.* 1973;14(6): 605-10.
- Hwang YH, Kim GD, Jeong JY, Hur SJ, Joo ST. The relationship between muscle fiber characteristics and meat quality traits of highly marbled Hanwoo (Korean native cattle) steers. *Meat Sci.* 2010;86(2): 456-461. doi: 10.1016/j.meatsci.2010.05.034.
- Jacob F, Guertler R, Naim S, Nixdorf S, Fedier A, Hacker NF, *et al.* Careful selection of reference genes is required for reliable performance of RT-qPCR in human normal and cancer cell lines. *PLoS One.* 2013;8(3): e59180. doi: 10.1371/journal.pone.0059180.
- Jeremiah LE, Dugan ME, Aalhus JL, Gibson LL. Assessment of the relationship between chemical components and palatability of major beef muscles and muscle groups. *Meat Sci.* 2003;65(3): 1013-1019. doi: 10.1016/S0309-1740(02)00309-1.
- Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, *et al.* Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput. Biol.* 2009;5(3): e1000324. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000324.
- Lee H, Lee S, Kim D, Park J, Han K. Cellularity of adipose tissue obtained from different sex and growth stages of Hanwoo cattle and sheep. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 2000;13(2): 155-160.
- Listrat A, Leuret B, Louveau I, Astruc T, Bonnet M, Lefaucheur L, *et al.* How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality. *ScientificWorldJournal.* 2016;2016: 3182746. doi: 10.1155/2016/3182746.
- Luo HF, Wei HK, Huang FR, Zhou Z, Jiang SW, Peng J. The effect of linseed on intramuscular fat content and adipogenesis related genes in skeletal muscle of pigs. *Lipids.* 2009;44(11): 999-1010. doi: 10.1007/s11745-009-3346-y.

- MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* 1995;64(1): 345-373.
- Martins TS, Sanglard LM, Silva W, Chizzotti ML, Renno LN, Serao NV, *et al.* Molecular Factors Underlying the Deposition of Intramuscular Fat and Collagen in Skeletal Muscle of Nellore and Angus Cattle. *PLoS One.* 2015;10(10): e0139943. doi: 10.1371/journal.pone.0139943.
- Matarese V, Bernlohr D. Purification of murine adipocyte lipid-binding protein. Characterization as a fatty acid-and retinoic acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* 1988;263(28): 14544-14551.
- McLaughlin T, Sherman A, Tsao P, Gonzalez O, Yee G, Lamendola C, *et al.* Enhanced proportion of small adipose cells in insulin-resistant vs insulin-sensitive obese individuals implicates impaired adipogenesis. *Diabetologia.* 2007;50(8): 1707-1015. doi: 10.1007/s00125-007-0708-y.
- Michal JJ, Zhang ZW, Gaskins CT, Jiang Z. The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. *Anim. Genet.* 2006;37(4): 400-402. doi: 10.1111/j.1365-2052.2006.01464.x.
- Moreno-Sanchez N, Rueda J, Carabano MJ, Reverter A, McWilliam S, Gonzalez C, *et al.* Skeletal muscle specific genes networks in cattle. *Funct. Integr. Genomics.* 2010;10(4): 609-618. doi: 10.1007/s10142-010-0175-2.
- Oddy VH, Harper GS, Greenwood PL, McDonagh MB. Nutritional and developmental effects on the intrinsic properties of muscles as they relate to the eating quality of beef. *Aust. J. Exp. Agric.* 2001;41(7): 921-942. doi: <http://dx.doi.org/10.1071/EA00029>.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids. Res.* 2001;29(9):e45.
- Picard B, Helene G, Geay Y. Contractile differentiation of bovine masseter muscle. *Basic. Appl. Myol.* 1996;6(5).
- Pickworth CL, Loerch SC, Velleman SG, Pate JL, Poole DH, Fluharty FL. Adipogenic differentiation state-specific gene expression as related to bovine carcass adiposity. *J. Anim. Sci.* 2011;89(2): 355-366. doi: 10.2527/jas.2010-3229.
- Renand G. L'amélioration génétique de la qualité de la viande dans les différentes espèces: situation actuelle et perspectives à court et moyen termes. *INRA Prod. Anim.* 2003;16 (3): 159-173.
- Robelin J, Picard B, Lustrat A, Jurie C, Barboiron C, Pons F, *et al.* Myosin expression in semitendinosus muscle during fetal development of cattle: immunocytochemical and electrophoretic analyses. *Reprod. Nutr. Dev.* 1993;33(1): 25-41.
- Roberts SL, Lancaster SA, DeSilva U, Horn GW, Krehbiel CR. *J. Anim. Sci.* 2015; 93: 4302-4311. doi:10.2527/jas2015-8886
- Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. *J. Biol. Chem.* 1964; 239: 375-380.

- Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*. 2006;444(7121): 847-853. doi: 10.1038/nature05483.
- Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, *et al.* Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*. 2000;289(5481): 950-953.
- Sainz R, Hasting E. Simulation of the development of adipose tissue in beef cattle. In: McNamara JP, France, J, Beever, DE, editors. *Modelling nutrient utilization in farm animals*; 2000. pp. 175-182.
- Schoonmaker JP, Fluharty FL, Loerch SC. Effect of source and amount of energy and rate of growth in the growing phase on adipocyte cellularity and lipogenic enzyme activity in the intramuscular and subcutaneous fat depots of Holstein steers. *J. Anim. Sci.* 2004;82(1): 137-148.
- Schwarz EJ, Reginato MJ, Shao D, Krakow SL, Lazar MA. Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPbeta-mediated transcription. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17(3): 1552-1561.
- Smith SB, Gill CA, Lunt DK, Brooks MA. Regulation of fat and fatty acid composition in beef cattle. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 2009;22(9): 1225-1233.
- Smith SB, Lin KC, Wilson JJ, Lunt DK, Cross HR. Starvation depresses acylglycerol biosynthesis in bovine subcutaneous but not intramuscular adipose tissue homogenates. *Comp. Biochem. Physiol. B., Biochem. Mol. Biol.* 1998;120(1): 165-174.
- Soret B, Mendizabal JA, Arana A, Alfonso L. Expression of genes involved in adipogenesis and lipid metabolism in subcutaneous adipose tissue and longissimus muscle in low-marbled Pirenaica beef cattle. *Animal*. 2016;10(12): 2018-2026. doi: 10.1017/S175173111600118X.
- Soula HA, Julienne H, Soulage CO, Geloën A. Modelling adipocytes size distribution. *J. Theor. Biol.* 2013;332: 89-95. doi: 10.1016/j.jtbi.2013.04.025.
- Steibel JP, Poletto R, Coussens PM, Rosa GJ. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics*. 2009;94(2): 146-152. doi: 10.1016/j.ygeno.2009.04.008.
- Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu. Rev. Biochem.* 2012;81: 715-736.
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*. 2010;50(4): S1-5. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.005.
- Thaller G, Kuhn C, Winter A, Ewald G, Bellmann O, Wegner J, *et al.* DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Anim. Genet.* 2003;34(5): 354-357.
- Tichopad A, Kitchen R, Riedmaier I, Becker C, Stahlberg A, Kubista M. Design and optimization of reverse-transcription quantitative PCR experiments. *Clin. Chem.* 2009;55(10): 1816-1823. doi: 10.1373/clinchem.2009.126201.

- Torrecano G, Sanchez-Escalante A, Gimenez B, Roncales P, Beltran JA. Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics. *Meat Sci.* 2003;64(1): 85-91.
- Totland GK, Kryvi H. Distribution patterns of muscle fibre types in major muscles of the bull (*Bos taurus*). *Anat. Embryol. (Berl)*. 1991;184(5): 441-450.
- Tume RK, Sikes AL, Smith SB. Enriching *M. sternomandibularis* with alpha-tocopherol by dietary means does not protect against the lipid oxidation caused by high-pressure processing. *Meat Sci.* 2010;84(1): 66-70. doi: 10.1016/j.meatsci.2009.08.013.
- Vernon R. The growth and metabolism of adipocytes. In: Buttery PJ, Haynes NB, Lindsay DB, editors. *Control and manipulation of animal growth*; 1986. pp. 67-83.
- Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, *et al.* Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell.* 1999;3(2): 151-158.

**CHAPTER 6. STUDY II**

**EFFECTS OF THE INTERACTION BETWEEN MUSCLE TISSUE TYPE AND  
GENOTYPE ON ADIPOGENIC GENE EXPRESSION**



## 1. INTRODUCTION

In different breeds, intramuscular fat (IMF) develops at different rate during growth, leading to different IMF accumulation and marbling scores at slaughter (Bruns *et al.*, 2004; Albrecht *et al.*, 2006). Different studies have reported IMF differences in *longissimus* muscle of distinct breeds such as Wagyu and Angus cattle (Duarte *et al.*, 2013), Nellore and Angus cattle (Martins *et al.*, 2015) or Pirenaica and Friesian bulls (Lizaso *et al.*, 2011). The expression of genes related to IMF deposition in different breeds have been studied as well. For instance, Du *et al.*, (2013) found distinct expression of genes such as *peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$*  (PPARG) and *CCAAT/ enhancer binding protein  $\alpha$*  (CEBPA) in *longissimus* muscle of Wagyu and Angus cattle with different IMF content. Studying the same breeds, Duarte *et al.* (2013) found that the expression of the adipogenic markers CEBPA, PPARG, and *zinc finger protein 423* (*Zfp423*) in Wagyu were greater than in Angus muscle, which was consistent with greater IMF deposition in Wagyu. On the other hand, Martins *et al.* (2015) observed a greater intramuscular fat content in skeletal muscle of Angus compared to Nellore cattle while no differences were found for mRNA expression of lipogenic and lipolytic markers such as *acetyl-CoA carboxylase synthase* (ACC), *fatty acid synthase* (FAS), *fatty acid binding protein 4* (FABP4), *sterol regulatory element-binding protein 1* (SERBP-1) and *lipoprotein lipase* (LPL) or the adipogenic markers *Zfp423*, PPARG, and CEBPA.

The Pirenaica breed is the most important beef cattle breed reared in the Pyrenees Mountains in northern Spain and it is reared most frequently under semi-extensive production systems (Serra *et al.*, 2008). On the other hand, male offspring of Friesian breed (a breed mainly used for milk production) contributes as well to meat production (Lizaso *et al.*, 2011), being the intensive system the prevalent production system for this breed (Serra *et al.*, 2008). As far as adipose tissue deposition is concerned, it has been previously shown that Pirenaica and Friesian breeds present different IMF development rates (Eguinoa *et al.*, 2013) and IMF deposition in the *longissimus* muscle as reported above (Lizaso *et al.*, 2011). Then, this two locally reared breeds show different tendency to accumulate adipose tissue.

In order to accomplish the study of the effect of breed, the results obtained in the first study of this work were taken into account and the *longissimus thoracis* (LT) and the *masseter* (MS) muscles were selected as representative in the light of the different amount of IMF and the adipocyte size distribution that could be accompanied by differences in the expression of adipogenic and lipogenic genes.

Then, the first aim of this work was to study the IMF content, the adipocyte size distribution and the expression of some adipogenic markers related to IMF deposition (*PPARG*, *CEBPA*, *FABP4* and *WNT10B*) in LT and MS muscles in Pirenaica, a beef oriented breed, and Friesian breed.

As already mentioned, the quantification of changes in the gene expression performed by the real time reverse transcription PCR (RT-qPCR) may be limited by a high variability associated to the results in RT-qPCR experiments (Pfaffl, 2001; Steibel *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2010; Jacob *et al.*, 2013). Therefore, the second objective was to study the main sources of experimental variability associated with gene expression between the muscles and the breeds considered in the present work.

## **2. RESULTS**

### **2.1. Animals**

LT and MS muscles of four Pirenaica and four Friesian bulls were studied. The animals of both breeds were slaughtered at commercial weights and ages. The Pirenaica bulls were harvested at  $11.94 \pm 0.93$  months of age, rendering carcass of  $323 \pm 18.00$  kg; the Friesian bulls were slaughtered at  $9.73 \pm 0.05$  months and the carcasses had an average weight of  $242 \pm 11.60$  kg.

### **2.2. Chemical traits**

Regarding the comparison between muscles, Pirenaica bulls presented IMF differences between LT and MS muscles ( $P < 0.05$ ) (Table 6.1), showing the MS muscle a higher IMF percentage, while the protein percentage and moisture values were similar. On the



other hand, Friesian bulls did not show statistically significant differences between both muscles in the chemical traits analysed.

**Table 6.1.** Mean values, mean standard errors and *P*-value for the comparison of descriptive parameters considered for the chemical traits measured in *longissimus thoracis* and *masseter* muscles for Pirenaica and Friesian bulls.

	Pirenaica				Friesian			
	<i>LT</i> <sup>1</sup>	<i>MS</i>	SEM	<i>P</i> -value	<i>LT</i>	<i>MS</i>	SEM	<i>P</i> -value
Fat, %	1.30	3.23	0.47	0.023	3.27	4.83	0.52	0.152
Protein, %	22.16	20.75	0.39	0.067	20.87	19.97	0.83	0.628
Moisture	74.52	75.49	0.51	0.387	72.34	71.28	1.30	0.714

<sup>1</sup> *LT*= *Longissimus thoracis*; *MS*= *Masseter*

Comparing the two breeds studied in the present work, fat percentage was significantly higher in *LT* muscle of Friesian than in Pirenaica bulls ( $P < 0.05$ ) whereas chemical traits did not differ statistically between the *MS* muscles of Pirenaica and Friesian bulls (Table 6.2).

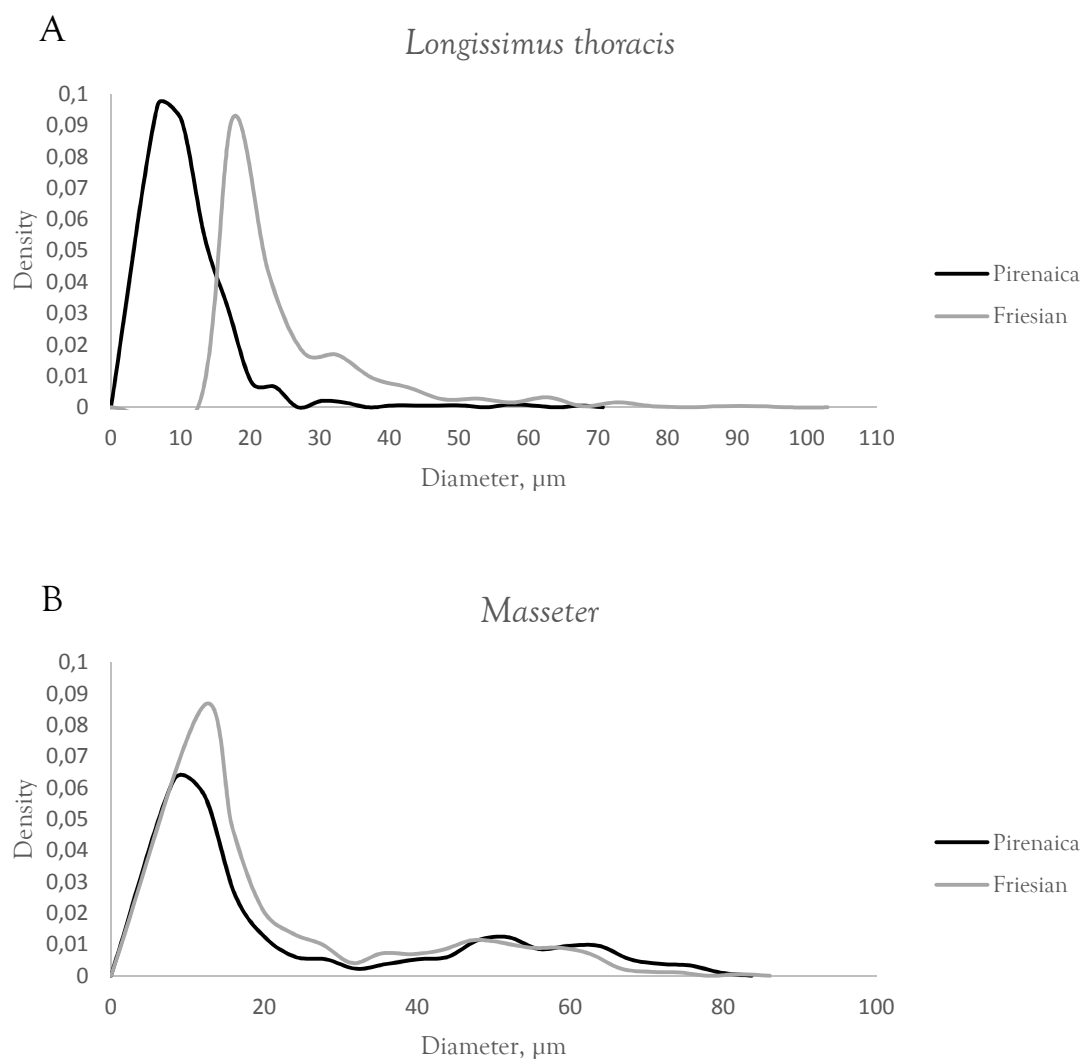
**Table 6.2.** Mean values, mean standard errors and *P*-value for the comparison of descriptive parameters considered for the chemical traits measured in Pirenaica and Friesian bulls for *longissimus thoracis* and *masseter* muscles.

	<i>LT</i>				<i>MS</i>			
	Pirenaica	Friesian	SEM	<i>P</i> -value	Pirenaica	Friesian	SEM	<i>P</i> -value
Fat, %	1.30	3.27	0.44	0.007	3.23	4.83	0.57	0.183
Protein, %	22.16	20.87	0.58	0.303	20.75	19.97	0.70	0.617
Moisture	74.52	72.34	0.81	0.196	75.49	71.28	1.43	0.151

<sup>1</sup> *LT*= *Longissimus thoracis*; *MS*= *Masseter*

### 2.3. Adipocyte size analysis

The adipocyte size distribution study performed for the adipose tissue from *LT* and *MS* muscles of Pirenaica and Friesian bulls is shown in Figure 6.1. The *LT* muscle (Figure 6.1, Panel A) presented a unimodal adipocyte size distribution in both breeds showing a unique adipocyte population. In the case of the Friesian bulls, the size distribution of *LT* muscle was displaced to the right indicating the presence of bigger adipocytes. The *MS* (Figure 6.1, Panel B) muscle showed a bimodal distribution of the adipocytes denoting two well defined adipocyte populations in both breeds.



**Figure 6.1.** Adipocyte cell-size distribution in *longissimus thoracis* (panel A) and *masseter* (panel B) muscles in Pirenaica and Friesian bulls.

The unimodality or bimodality of the adipocyte size distribution was also studied on the basis of the BC and Dip tests implemented in the AdipSD software described in “Materials and Methods” 7.2 section. The results of these tests pointed out that the size distribution of the adipocytes in *LT* muscle was unimodal (BC=0.63; Dip *P*-value > 0.05) and bimodal in *MS* muscle (BC=0.79; Dip *P*-value < 0.05) in the Pirenaica bulls. In the case of Friesian bulls, BC and Dip tests indicated unimodality for adipocytes of the *LT* muscle (BC=0.64, Dip *P*-value > 0.05) and as well for the cells of *MS* (BC=0.75; Dip *P*-value > 0.05); this last result contrasts with the adipocyte size distribution showed in the Figure 1, Panel B. As previously described in “Materials and Methods”, section 7.2, the bimodality is a complex phenomenon and may thus potentially manifest in ways that BC and Dip test cannot reveal. Therefore, taking into account the result obtained from the adipocyte size analysis and the limitations of the estimations commented, the adipocyte size distribution of *MS* muscle was considered bimodal.

The results obtained for *LT* muscle showed that the minimum adipocyte size, the median, and the mean were bigger in Friesian bulls compared to Pirenaica (*P* < 0.05) (Table 6.3).

**Table 6.3.** Descriptive parameters for adipocyte size distribution in *longissimus thoracis* muscle in Pirenaica and Friesian bulls, mean standard errors and *P*-value.

Item	<i>LT</i> <sup>1</sup>			
	Pirenaica	Friesian	SEM	<i>P</i> -value
Minimum, μm	5.68	10.10	0.85	0.000
Maximum, μm	48.78	76.97	8.60	0.102
Median, μm	10.11	17.05	1.59	0.012
Mean, μm	13.25	20.78	1.85	0.025
Mode, μm	10.35	12.76	0.69	0.077

<sup>1</sup>*LT*= *Longissimus*

The minimum size of the adipocytes presented differences between both breeds in the *MS* muscle (*P* > 0.05). On the contrary, the other descriptive parameters for the

adipocyte size distribution: maximum, nadir, % above the nadir, ratio small/large adipocytes, first and second mode in the MS muscle of Pirenaica and Friesian were similar ( $P < 0.05$ ) (Table 6.4).

**Table 6.4.** Descriptive parameters for adipocyte size distribution in *masseter* muscle in Pirenaica and Friesian bulls, mean standard errors and *P*-value.

Item	MS <sup>1</sup>		SEM	P-value
	Pirenaica	Friesian		
Minimum, $\mu\text{m}$	7.25	10.33	0.68	0.008
Maximum, $\mu\text{m}$	69.50	74.90	2.97	0.406
Nadir, $\mu\text{m}$	27.07	29.30	1.98	0.613
% above the nadir	35.62	45.34	9.50	0.647
Small/large	1.97	7.14	2.82	0.400
First mode, $\mu\text{m}$	10.68	13.23	0.78	0.103
Second mode, $\mu\text{m}$	55.26	49.98	3.09	0.449

<sup>1</sup>MS= *Masseter*

## 2.4. Gene expression

In order to compare and determine if there were differences in the gene expression of the target genes between the muscles studied in the Pirenaica and Friesian bulls, a MIXED model was used.

Pirenaica bulls presented a higher expression of *FABP4* gene in *LT* muscle ( $P < 0.05$ ) compared to *MS* muscle (Table 6.5). On the contrary, *PPARG*, *CEBPA* and *WNT10B* expression was similar between *LT* and *MS* muscles. In Friesian bulls, the four adipogenic genes studied (*PPARG*, *CEBPA*, *FABP4* and *WNT10B*) had a similar expression between *LT* and *MS* muscles (Table 6.5).

**Table 6.5.** Differences in normalised expression values in *longissimus thoracis* and *masseter* for Pirenaica and Friesian bulls.

Gene	Contrast	Pirenaica			Friesian			
		DIF <sup>1</sup>	SEM	P-value	Contrast	DIF	SEM	P-value
PPARG <sup>2</sup>	LT-MS <sup>3</sup>	0.50	0.42	0.23	LT-MS	0.19	0.31	0.53
CEBPA	LT-MS	0.39	0.45	0.40	LT-MS	0.25	0.36	0.50
FABP4	LT-MS	1.34	0.57	0.02	LT-MS	0.58	0.52	0.27
WNT10B	LT-MS	-0.38	0.63	0.55	LT-MS	-0.07	0.33	0.84

<sup>1</sup>DIF contrasted differences between normalised -Ct values.

<sup>2</sup>PPARG= Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ , CEBPA= CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$ , FABP4= Fatty acid binding protein 4, WNT10B= Wingless-Int10b.

<sup>3</sup>LT= *Longissimus thoracis*; MS= *Masseter*

Comparing both breeds, the results showed that the LT and MS muscles presented a higher expression of PPARG in Pirenaica breed. Conversely, FABP4 expression was significantly higher in Friesian breed than in Pirenaica (Table 6.6). No differences were found for CEBPA and WNT10B.

**Table 6.6.** Differences in normalised -expression values in *longissimus thoracis* and *masseter* muscles for Pirenaica and Friesian bulls.

Gene	Contrast	LT <sup>1</sup>			MS			
		DIF <sup>2</sup>	SEM	P-value	Contrast	DIF	SEM	P-value
PPARG <sup>3</sup>	Pir-Fri <sup>4</sup>	1.11	0.36	0.003	Pir-Fri	0.81	0.36	0.026
CEBPA	Pir-Fri	-0.64	0.38	0.098	Pir-Fri	-0.77	0.42	0.072
FABP4	Pir-Fri	-1.98	0.57	0.001	Pir-Fri	-2.74	0.51	0.000
WNT10B	Pir-Fri	-0.77	0.57	0.180	Pir-Fri	-0.45	0.38	0.241

<sup>1</sup> LT= *Longissimus thoracis*; MS= *Masseter*

<sup>2</sup>DIF contrasted differences between normalised -Ct values.

<sup>3</sup>PPARG= Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ , CEBPA= CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$ , FABP4= Fatty acid binding protein 4, WNT10B= Wingless-Int10b.

<sup>4</sup>Pir=Pirenaica; Fri=Friesian

## 2.5. Variability analysis

The nested design used in the present work resulted in 48 readings for each gene, muscle and breed analysed (4 animals x 3 samples x 2 RTs, 2 qPCRs).

Mean Cqs for each gene, estimated standard deviations of the different factors that affect the experiment and total noise obtained from the variability analysis of the *LT* and *MS* muscles in Pirenaica and Friesian bulls are shown in Table 6.7.

The factor “animal” represented the lower contribution to the total variance in almost all cases. The processing steps sampling and RT, represented the highest percentage of the total variance in Pirenaica and Friesian bulls (76% and 84% for *LT* and *MS* muscles respectively) while the mean percentage of the total variance represented by qPCR step was below 15%. No differences in the contribution to the total variance of the distinct processing steps were observed between the two breeds studied. The coefficient of variation (CV) expressed as a percentage (Table 6.7) was low, below 7.06%, in all cases. In order to facilitate the comprehension of the results, the contributions to the variance of the processing steps to the overall noise were also expressed as percentages (Figure 6.2).

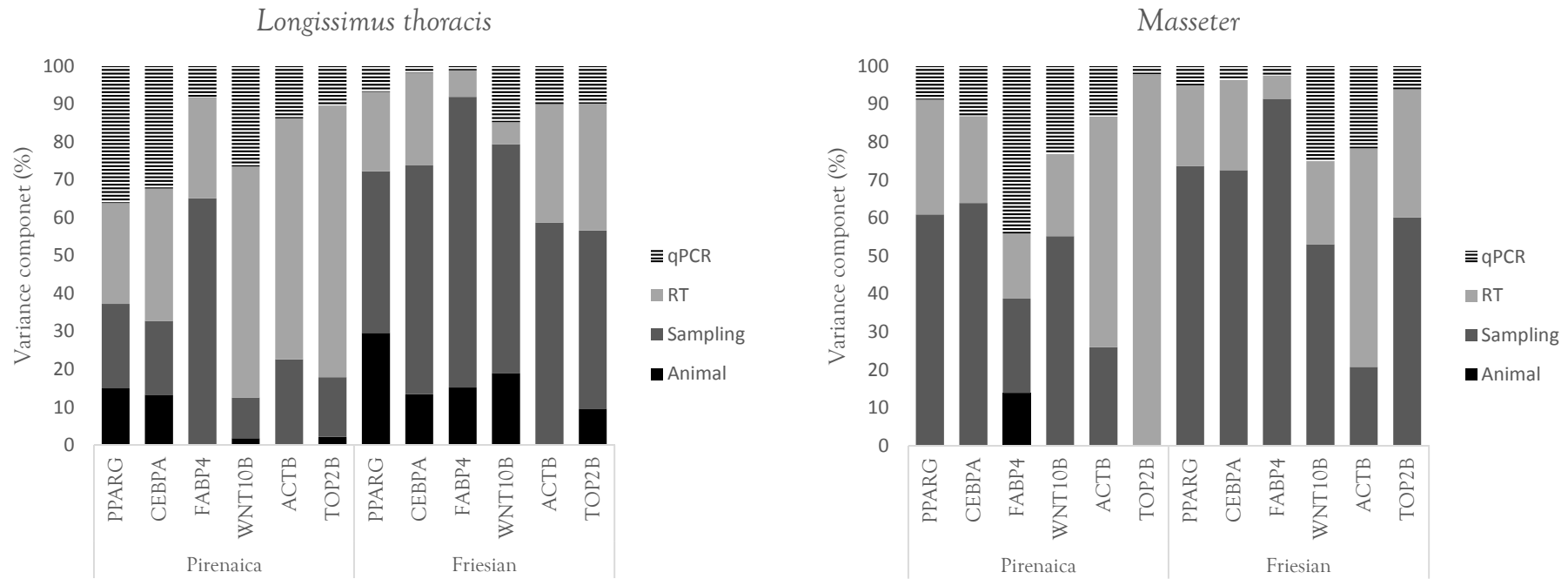
**Table 6.7.** Mean, Minimum, maximum, and CV of the Cq values, estimated standard deviations for inter-animal variation, processing steps (Sampling, RT and qPCR) and total variance in *longissimus thoracis* (A) and *masseter* (B) muscle for adipogenic markers in Pirenaica and Friesian bulls.

A	Pirenaica						Friesian					
	Item	PPARG <sup>1</sup>	CEBPA	FABP4	WNT10B	ACTB	TOP2B	PPARG	CEBPA	FABP4	WNT10B	ACTB
Mean Ct	26.43	28.90	25.63	32.20	22.93	24.32	26.28	26.93	22.19	30.17	20.52	23.93
Minimum Ct	23.64	26.21	20.89	29.08	20.13	22.22	24.74	25.02	19.74	28.60	18.64	22.49
Maximum Ct	28.56	30.91	29.69	39.44	26.27	28.08	28.18	29.05	25.24	32.54	22.59	25.86
CV (%)	3.87	2.94	7.01	6.89	7.06	6.09	3.15	3.63	5.35	3.20	3.82	2.85
$\hat{\sigma}$												
Animal	0.40	0.31	0.00	0.28	0.00	0.22	0.48	0.37	0.48	0.44	0.00	0.22
Sampling	0.49	0.37	1.51	0.69	0.80	0.60	0.57	0.79	1.09	0.78	0.66	0.48
RT	0.53	0.50	0.96	1.64	1.45	1.27	0.40	0.50	0.33	0.24	0.48	0.41
qPCR	0.62	0.48	0.54	1.08	0.72	0.48	0.23	0.14	0.13	0.39	0.27	0.22
Total	1.03	0.84	1.87	2.10	1.80	1.50	0.87	1.02	1.24	1.01	0.86	0.71

B	Pirenaica						Friesian					
	Item	PPARG	CEBPA	FABP4	WNT10B	ACTB	TOP2B	PPARG	CEBPA	FABP4	WNT10B	ACTB
Mean Ct	26.38	28.79	26.46	31.34	22.12	23.90	26.09	26.80	22.41	29.69	20.31	23.36
Minimum Ct	25.06	25.70	24.11	28.22	19.98	21.87	25.25	25.67	20.54	28.38	19.59	22.39
Maximum Ct	28.50	31.09	29.91	33.35	24.82	27.74	28.06	29.02	25.70	31.64	22.05	25.20
CV (%)	3.53	4.15	4.44	3.87	5.91	5.86	2.43	2.87	6.07	2.28	2.76	2.33
$\hat{\sigma}$												
Animal	0.00	0.00	0.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sampling	0.77	1.05	0.57	0.87	0.72	0.00	0.58	0.68	1.43	0.53	0.27	0.48
RT	0.54	0.63	0.47	0.54	1.10	1.49	0.31	0.39	0.37	0.34	0.45	0.36
qPCR	0.29	0.48	0.76	0.56	0.52	0.22	0.15	0.15	0.23	0.37	0.28	0.14
Total	0.99	1.31	1.14	1.17	1.41	1.51	0.68	0.79	1.50	0.73	0.60	0.62

<sup>1</sup>PPARG= Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ . CEBPA= CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$ . FABP4= Fatty acid binding protein. 4 WNT10B= Wingless-Int10b; ACTB=  $\beta$ -actin; TOP2B= Topoisomerase II-beta.



**Figure 6.2.** Standard deviations contributing for the sampling-processing steps expressed as percentages in *longissimus thoracis* and *masseter* muscles of Pirenaica and Friesian bulls. *PPARG*= *peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$* ; *CEBPA*= *CCAAT/enhancer binding  $\alpha$* ; *FABP4*= *fatty acid binding protein 4* and *WNT10B*= *wingless-type MMTV integration site family 10*; *ACTB*=  *$\beta$ -actin*; *TOP2B*= *Topoisomerase II-beta*.



### 3. DISCUSSION

It is accepted that IMF content varies according to factors such as the origin of the muscle, the age, the maturity rate of the animal, and the diet of cattle (Ralston *et al.*, 1966; Mourot and Hermier, 2001; Hocquette *et al.*, 2010) and that those factors affect the nutritional and organoleptic quality of meat (Serra *et al.*, 2008). Concerning the genotype effect, different studies determined variations in the potential of IMF deposition between different cattle breeds (Williams *et al.*, 1995; Gotoh *et al.*, 2009; Albrecht *et al.*, 2011; Duarte *et al.*, 2013). However, elucidating the breed effect on meat quality is complex due to its interaction with other factors such as live weight, carcass weight or the management practices (Gorraiz *et al.*, 2002; Serra *et al.*, 2008).

Differences in the IMF percentage between the two breeds included in the present study have been previously reported, showing that the *LT* muscle presented a higher lipid content in Friesian bulls compared to Pirenaica breed (Lizaso *et al.*, 2011; Sevane *et al.*, 2013). In the current work, the fat percentage was significantly higher in *LT* muscle of Friesian bulls than in the same muscles of Pirenaica bulls ( $P < 0.05$ ) (Table 6.2) in spite of the former having lower age and carcass weight, which agreed with the consideration of Pirenaica as a late maturing breed compared to Friesian breed, the last one showing an earlier development of the IMF (Eguinoa *et al.*, 2013). On the contrary, the chemical traits in the *MS* muscle, including the IMF, did not statistically differ between Pirenaica and Friesian bulls.

The muscle effect results obtained for the Pirenaica bulls pointed out a lower IMF percentage in the *LT* muscle, which presented a unimodal adipocyte size distribution compared to *MS* muscle, whose adipocyte size distribution was bimodal. The different IMF percentage measured in the distinct muscles agreed with the fact that differences in the fat accretion and metabolism might be related to the diverse anatomical regions and functionalities presented by the muscles (Costa *et al.*, 2008; Hocquette *et al.*, 2010). However no statistically significant differences in the IMF content were found between *LT* and *MS* muscles of Friesian bulls (Table 6.2). It should be taken into account that the fat development is not considered as a continuous process that takes place in all body adipose depots synchronously (Marchello and Hate, 1974) and the IMF deposition

in the *LT* and *MS* muscles could occur at different points in the development. Indeed, the results obtained in the Study I, suggested that the IMF develops later in *LT* than in *MS* resulting in a delay in the fat deposition in that muscle in Pirenaica bulls, as corroborated by the greater amount of fat in *MS* muscle.

Studies examining the size distribution of adipose cells might help to gain knowledge of the mechanism that regulates adipose accretion (Jo *et al.*, 2012; Alzon *et al.*, 2007), then, Pirenaica and Friesian adipocyte size distribution in *LT* muscle was analysed, observing than in both cases was unimodal. This agreed with the results observed in a previous study by Soret *et al.* (2016) who also found unimodal distribution for the adipocytes in *LT* muscle of Pirenaica bulls. The relative contributions of the two mechanisms which regulates the adipose growth: hyperplasia (cell number increase) and hypertrophy (cell size increase), vary among different breeds, tissue locations and age (Cianzio *et al.*, 1982, Vernon, 1986; Jo *et al.*, 2009). The predominance of small adipocytes in *LT* muscle of Pirenaica and Friesian bulls pointed out that the fat development may have took place mainly by hyperplasia. The bigger adipocytes observed in the *LT* muscle of Friesian bulls compared to Pirenaica would indicate that, in addition to the hyperplasia, the hypertrophy process has taken place in the *LT* muscle of Friesian bulls at a higher rate than in the Pirenaica bulls. In accordance, a higher IMF content was measured in that muscle of Friesian bulls compared to Pirenaica (Table 6.2). Regarding *MS* muscle, the bimodal distribution observed in Pirenaica and Friesian bulls would indicate that both hyperplasia and hypertrophy processes were actively involved in the *MS* muscle IMF accretion. With respect to the descriptive parameters for the adipocyte size analysis, the similar values obtained between the *MS* muscles of Pirenaica and Friesian bulls were in concordance with the similar IMF content measured in both muscles (Table 6.1).

At the molecular level, it is well known that *PPARG* and *CEBPA* have key regulatory roles in the differentiation of pre-adipocytes into adipocytes (Avram *et al.*, 2007, Martins *et al.*, 2015). The expression of both genes has been positively related to IMF content in cattle by some authors (Du *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2013). On the contrary, other studies did not found differences for mRNA expression of the adipogenic genes *PPARG* and *CEBPA* in *longissimus* muscle despite a greater intramuscular fat content, such as the

study performed by Martins *et al.* (2015) comparing Angus and Nellore cattle *longissimus* muscle. The *PPARG* gene has been identified as the master regulator of adipogenesis (Tontonoz *et al.*, 1994; Rosen and Spiegelman, 2000), and its central role in the control of the terminal differentiation of preadipocytes has been reported in bovine white adipose tissue (Ohyama *et al.*, 1998; Torii *et al.*, 1998). In the present work, the *LT* and *MS* muscles of Pirenaica bulls presented higher *PPARG* expression than the same muscles of Friesian bulls (Table 6.5). Although *PPARG* is expressed in mature adipocytes, its peak expression occurs during adipocyte differentiation in preadipocytes (Pickworth *et al.*, 2011). Therefore the difference in *PPARG* expression might be related to a possible more active preadipocyte population in the Pirenaica muscles compared to Friesian bulls. On the other hand, there were no differences in the *CEBPA* expression between the muscles of Pirenaica and Friesian bulls in spite of the distinct values of IMF content and the descriptive parameters of the adipocyte size analysis between *LT* muscles of both breeds.

Terminal differentiation of adipocytes requires up-regulation of *FABP4* (Graugnard *et al.*, 2009) so its expression is closely related to fat deposition (Barendse *et al.*, 2009; Michal *et al.*, 2006; Thaller *et al.*, 2003) and adipocyte hypertrophy (Pickworth *et al.*, 2011). Both the *LT* and the *MS* muscles in Friesian bulls had greater relative expression of *FABP4* than those muscles in Pirenaica bulls which, in the case of the *LT* muscle corresponded with the bigger adipocytes measured. However, in the *MS* muscle the IMF content and the adipocyte size parameters were similar in both breeds, although it seems to have a tendency to bigger cells in Friesian *vs* Pirenaica bulls (Figure 6.1). Due to the role of *FABP4* in the incorporation of the exogenous long chain fatty acids into the cells, dairy selected animals such as Friesians could have a more active expression of this gene. Then, the higher *FABP4* expression in Friesian bulls could be related to a higher number of adipocytes in the muscles studied, presenting thus in total a bigger cell surface and favouring a bigger amount of *FAPB4* and the cellular hypertrophy.

Regarding the *WNT10B* gene expression, is related to the repression of some genes that induce the IMF deposition (Luo *et al.*, 2009) such as the master adipogenic transcription factors *PPARG* and *CEBPA* (Longo *et al.*, 2004). *WNT10B* is expressed in preadipocytes

and stromal vascular cells (which contains predominantly preadipocytes) but not in differentiated adipocytes (Wright *et al.*, 2007) which is consistent with the role of *WNT10B* in maintaining the preadipocytes in an undifferentiated state (Bennett *et al.*, 2002). The results showed similar expression of *WNT10B* gene between the *LT* and *MS* muscles in Pirenaica and Friesian bulls, which might be expressing at level that does not prevent adipogenesis and expression of adipogenic genes such as *PPARG* (higher in Pirenaica bulls) and *FABP4* (higher in Friesian bulls).

The study of gene expression may be limited by the high variability associated with the results in RT-qPCR experiments. Thus, in order to improve the interpretation of the results, is necessary to minimize that variability. In addition, the ability to detect relevant differences may be hampered by the confusion between the biological variation and the variation associated with experimental work (Tichopad *et al.*, 2009). The optimal experimental design requires a deep knowledge of the sources of error throughout sample processing which in a qPCR like the performed in the present study, involves sampling the biological material, extracting the RNA, reverse transcription (RT) of the RNA into cDNA, and amplification of the cDNA by the qPCR.

There are only a few studies that have undertaken the study of the variability of gene expression especially of the gene expression of markers related to IMF development in cattle. In general terms, experiments are designed and conducted with emphasis on the amplification step not taking into account the preceding steps and their contribution to the measurement error (Tichopad *et al.*, 2009). In the present work a design taking into account the preceding steps to the amplification by qPCR, and their contribution to the measurement error was applied. The results obtained from the variability study denoted that, sampling and RT presented the higher variability (Table 6.7) (Figure 6.2). For the two breeds included in the present study, Pirenaica and Friesian, the sum of both factors represented the 76% of the total variability in *LT* muscle and 84% in the *MS* muscle (Figure 6.2). Those results agreed with other works which recommended the use of sample replicates preferentially to any other replicates when working with solid tissues (Tichopad *et al.*, 2009) and empathised on the importance of taking more than a single sample per tissue (Cruz *et al.*, 2014). The final processing step qPCR showed the highest repeatability because its contribution to the total variance was consistently lower than

the contribution of the other steps. The variability related to the factor “animal”, which included individuals of Pirenaica and Friesian breed, and therefore, represented the biological variation among animals and breeds, was smaller in comparison with the other factors. However, the factor “animal” was the most difficult to estimate adequately given the small number of animals used in this study for each breed. In view of the results it would be appropriate the inclusion of sample and RT replicates in the design of future experiments preferentially to any other replicates due to the high variability showed regardless the gene, muscle of breed studied. That would contribute to reduce the results variability resulting in an efficiently detection of changes in gene expression.

#### 4. REFERENCES

- Albrecht E, Teuscher F, Ender K, Wegner J. Growth- and breed-related changes of marbling characteristics in cattle. *J Anim Sci.* 2006;84(5):1067-75.
- Albrecht E, Gotoh T, Ebara,F, Xu J.X, Viergutz T, Nürnberg G *et al.* Cellular conditions for intramuscular fat deposition in Japanese Black and Holstein steers. *Meat Sci.* 2011;89(1):13-20. 10.1016/j.meatsci.2011.03.012.
- Alzon M, Mendizabal JA, Arana A, Alberti P, Purroy A. Adipocyte cellularity in different adipose depots in bulls of seven Spanish breeds slaughtered at two body weights. *Animal.* 2007;1(2):261-7. 10.1017/S1751731107392744.
- Avram MM, Avram AS, James WD. Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J Am Acad Dermatol.* 2007;56(3):472-92. 10.1016/j.jaad.2006.06.022.
- Barendse W, Bunch RJ, Thomas MB, Harrison BE. A splice site single nucleotide polymorphism of the fatty acid binding protein 4 gene appears to be associated with intramuscular fat deposition in longissimus muscle in Australian cattle. *Anim Genet.* 2009;40(5):770-3. 10.1111/j.1365-2052.2009.01913.x.
- Bennett CN, Ross SE, Longo KA, Bajnok L, Hemati N, Johnson KW, *et al.* Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 2002;277(34): 30998-31004. doi: 10.1074/jbc.M204527200.
- Bruns KW, Pritchard RH, Boggs DL. The relationships among body weight, body composition, and intramuscular fat content in steers. *J Anim Sci.* 2004;82(5):1315-22.
- Cianzio DS, Topel DG, Whitehurst GB, Beitz DC, Self HL. Adipose Tissue Growth in Cattle Representing Two Frame Sizes: Distribution among Depots1. *J Anim Sci.* 1982;55(2):305-12.

- Costa P, Roseiro LC, Bessa RJ, Padilha M, Partidario A, Marques de Almeida J, *et al.* Muscle fiber and fatty acid profiles of Mertolenga-PDO meat. *Meat Sci.* 2008;78(4):502-12. 10.1016/j.meatsci.2007.07.020.
- Chung KY, Lunt DK, Kawachi H, Yano H, Smith SB. Lipogenesis and stearyl-CoA desaturase gene expression and enzyme activity in adipose tissue of short- and long-fed Angus and Wagyu steers fed corn- or hay-based diets. *J Anim Sci.* 2007;85(2):380-7. 10.2527/jas.2006-087.
- Du M, Huang Y, Das AK, Yang Q, Duarte MS, Dodson MV, *et al.* Meat Science and Muscle Biology Symposium: manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. *J Anim Sci.* 2013;91(3):1419-27. 10.2527/jas.2012-5670.
- Du M, Yin J, Zhu MJ. Cellular signaling pathways regulating the initial stage of adipogenesis and marbling of skeletal muscle. *Meat Sci.* 2010;86(1):103-9. 10.1016/j.meatsci.2010.04.027.
- Duarte MS, Paulino PV, Das AK, Wei S, Seroo NV, Fu X, *et al.* Enhancement of adipogenesis and fibrogenesis in skeletal muscle of Wagyu compared with Angus cattle. *J Anim Sci.* 2013;91(6):2938-46. 10.2527/jas.2012-5892.
- Eguinoa P, Brocklehurst S, Arana A, Mendizabal JA, Vernon RG, Purroy A. Lipogenic enzyme activities in different adipose depots of Pirenaican and Holstein bulls and heifers taking into account adipocyte size. *J Anim Sci.* 2003;81(2):432-40.
- Gorraiz C, Beriain MJ, Chasco J, Insausti K. Effect of Aging Time on Volatile Compounds, Odor, and Flavor of Cooked Beef from Pirenaica and Friesian Bulls and Heifers. *Journal of Food Science.* 2002;67(3):916-22. 10.1111/j.1365-2621.2002.tb09428.x.
- Gotoh T, Albrecht E, Teuscher F, Kawabata K, Sakashita K, Iwamoto H, *et al.* Differences in muscle and fat accretion in Japanese Black and European cattle. *Meat Sci.* 2009;82(3):300-8. 10.1016/j.meatsci.2009.01.026.
- Graugnard DE, Piantoni P, Bionaz M, Berger LL, Faulkner DB, Looor JJ. Adipogenic and energy metabolism gene networks in longissimus lumborum during rapid post-weaning growth in Angus and Angus x Simmental cattle fed high-starch or low-starch diets. *BMC Genomics.* 2009;10:142. 10.1186/1471-2164-10-142.
- Hocquette JF, Gondret F, Baeza E, Medale F, Jurie C, Pethick DW. Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal.* 2010 ;4(2):303-19. 10.1017/S1751731109991091.
- Jacob F, Guertler R, Naim S, Nixdorf S, Fedier A, Hacker NF, *et al.* Careful selection of reference genes is required for reliable performance of RT-qPCR in human normal and cancer cell lines. *PLoS One.* 2013;8(3):e59180. 10.1371/journal.pone.0059180.

- Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, *et al.* Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol.* 2009;5(3):e1000324. 10.1371/journal.pcbi.1000324.
- Jo J, Shreif Z, Periwal V. Quantitative dynamics of adipose cells. *Adipocyte.* 2012;1(2):80-8. 10.4161/adip.19705.
- Lizaso G, Beriain MJ, Horcada A, Chasco J, Purroy A. Effect of intended purpose (dairy/beef production) on beef quality. *Canadian Journal of Animal Science.* 2011;91(1):97-102. 10.4141/cjas10078.
- Longo KA, Wright WS, Kang S, Gerin I, Chiang SH, Lucas PC, *et al.* Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. *J Biol Chem.* 2004;279(34):35503-9. 10.1074/jbc.M402937200.
- Luo HF, Wei HK, Huang FR, Zhou Z, Jiang SW, Peng J. The effect of linseed on intramuscular fat content and adipogenesis related genes in skeletal muscle of pigs. *Lipids.* 2009;44(11):999-1010. 10.1007/s11745-009-3346-y.
- Marchello and Hate. Board on Agriculture and Renewable Resources. *Fat Content and Composition of Animal Products: Proceedings of a Symposium Washington, D.C. 1974.*
- Martins TS, Sanglard LM, Silva W, Chizzotti ML, Renno LN, Seroo NV, *et al.* Molecular Factors Underlying the Deposition of Intramuscular Fat and Collagen in Skeletal Muscle of Nellore and Angus Cattle. *PLoS One.* 2015;10(10):e0139943. 10.1371/journal.pone.0139943.
- Michal JJ, Zhang ZW, Gaskins CT, Jiang Z. The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. *Anim Genet.* 2006;37(4):400-2. 10.1111/j.1365-2052.2006.01464.x.
- Mourot J, Hermier D. Lipids in monogastric animal meat. *Reprod Nutr Dev.* 2001;41(2):109-18.
- Ohyama M, Matsuda K, Torii S, Matsui T, Yano H, Kawada T, *et al.* The interaction between vitamin A and thiazolidinedione on bovine adipocyte differentiation in primary culture. *J Anim Sci.* 1998;76(1):61-5.
- Pickworth CL, Loerch SC, Velleman SG, Pate JL, Poole DH, Fluharty FL. Adipogenic differentiation state-specific gene expression as related to bovine carcass adiposity. *J Anim Sci.* 2011;89(2):355-66. 10.2527/jas.2010-3229.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
- Ralston AT, Kennick WH, Davidson TP, Rowe KE. Effect of prefinishing treatment upon finishing performance and carcass characteristics of beef cattle. *J Anim Sci.* 1966;25(1):29-33.
- Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:145-71. 10.1146/annurev.cellbio.16.1.145.



- Serra X, Guerrero L, Guardia MD, Gil M, Sanudo C, Panea B, *et al.* Eating quality of young bulls from three Spanish beef breed-production systems and its relationships with chemical and instrumental meat quality. *Meat Sci.* 2008;79(1):98-104. 10.1016/j.meatsci.2007.08.005.
- Sevane N, Armstrong E, Cortes O, Wiener P, Wong RP, Dunner S. Association of bovine meat quality traits with genes included in the PPARG and PPARGC1A networks. *Meat Sci.* 2013;94(3):328-35. 10.1016/j.meatsci.2013.02.014.
- Soret B, Mendizabal JA, Arana A, Alfonso L. Expression of genes involved in adipogenesis and lipid metabolism in subcutaneous adipose tissue and longissimus muscle in low-marbled Pirenaica beef cattle. *Animal.* 2016;10(12):2018-26. 10.1017/S175173111600118X.
- Steibel JP, Poletto R, Coussens PM, Rosa GJ. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics.* 2009;94(2):146-52. 10.1016/j.ygeno.2009.04.008.
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods.* 2010;50(4):S1-5. 10.1016/j.ymeth.2010.01.005.
- Thaller G, Kuhn C, Winter A, Ewald G, Bellmann O, Wegner J, *et al.* DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Anim Genet.* 2003;34(5):354-7.
- Tichopad A, Kitchen R, Riedmaier I, Becker C, Stahlberg A, Kubista M. Design and optimization of reverse-transcription quantitative PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(10):1816-23. 10.1373/clinchem.2009.126201.
- Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 1994;8(10):1224-34.
- Torii SKUJ, Ohyama M, Matsui T, Yano H. Ascorbic acid-2-phosphate enhances adipocyte differentiation of cultured stromal vascular cells prepared from bovine perirenal adipose tissue. *Animal Science and Technology (Japan).* may1998;v. 69.
- Vernon R. The growth and metabolism of adipocytes. In: Buttery PJ, Haynes NB, Lindsay DB, editors. *Control and manipulation of animal growth*; 1986. pp. 67-83.
- Williams CB, Bennett GL, Keele JW. Simulated influence of postweaning production system on performance of different biological types of cattle: III. Biological efficiency. *J Anim Sci.* 1995;73(3):686-98.
- Wright W.S, Longo K.A, Dolinsky V.W, Gerin I, Kang S, Bennett C *et al.* Wnt10b Inhibits Obesity in ob/ob and Agouti Mice. *Diabetes.* 2007 VOL. 56,



**CHAPTER 7: STUDY III.**

**RELATIONSHIP BETWEEN THE EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN  
ADIPOGENESIS, MYOGENESIS AND FIBROGENESIS.**



## 1. INTRODUCTION

It is well known that intramuscular fat (IMF) is important for meat palatability and other meat quality attributes (Tong *et al.*, 2008; Hausman *et al.*, 2009) and thus it is of economic importance (Roberts *et al.*, 2015). However, intensive genetic selection of beef cattle has favored muscle growth reducing the IMF deposition and then, marbling in meat (Albrecht *et al.*, 2011), which might compromise its organoleptic quality (Du *et al.*, 2010). The level of IMF considered adequate for beef, from an organoleptic point of view, is between the 3% and 4% (Savell and Cross, 1988). In addition, it has been shown that the ability to accumulate IMF varies between muscles and breeds in beef cattle. The nutritional management in bovine has been studied as a method to improve the carcass value by increasing IMF deposition (Du *et al.*, 2013). In this regard, some authors had found positive relationships between management changes such as a high-energy grain feeding and final IMF content at different stages of development of bovine animals (Wertz *et al.*, 2001; Wertz *et al.*, 2002; Johnston *et al.*, 2003; Reverter *et al.*, 2003). However, extending the fattening period from 12 (the usual point) to 18 months or increasing the energy density did not have effect in the IMF content of Pirenaica cattle, which have a low tendency to accumulate IMF (Soret *et al.*, 2016).

The common mesenchymal origin of fibroblast, myocytes and adipocytes (Du *et al.*, 2013) and the fact that the IMF develops within close proximity to muscle fibers and connective tissue (Duarte *et al.*, 2013), leads to believe that signaling and cross-talk between myocytes, fibrogenic cells and adipocytes may influence IMF development. Extending the knowledge of the mechanisms that regulate the IMF development would help to improve management strategies in order to increase it. Some authors have found the manipulation of the differentiation of the progenitor cells as an opportunity to enhance lean growth, reduce connective tissue accumulation, and alter fat deposition (Du *et al.*, 2013).

Attending to connective tissue formation, the collagen synthesis it is primarily mediated by the *transforming growth factor* signaling pathway (*TGFB1*) (Chen *et al.*, 2005, Salvadori *et al.*, 2005) in particular by the *TGFB1* isoform which is mainly expressed in the fibroblasts (Ghosh *et al.*, 2005). *TGFB1* induces the expression of fibrogenic genes,

including *fibronectin (FN1)* (Kennedy *et al.*, 2008), *fibroblast growth factor 2 (FGF2)* and *fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)* (Giannouli and Kletsas 2006). On other hand muscle formation is mainly regulated by the myogenic regulatory factors (MRFs). The *Myogenic factor 5 (Myf5)* and *Myogenic differentiation 1 (MyoD)* genes have been identified as early differentiation MFRs (Francetic and Liy, 2011; Tajbakhsh and Buckingham, 2000) while *Myogenin (MyoG)* is considered a terminal differentiation factor of myofibers (Berkes and Tapscott, 2005; Singh and Dilworth, 2013).

In the present work, the main purpose was to study the IMF and the collagen content and the expression of some genes related to the fibrogenesis, myogenesis and adipogenesis. With this aim, the fibrogenic and myogenic genes introduced above and the early adipogenesis gene *zinc finger protein (Zfp423)* (Gupta *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012) were selected. In addition the expression of some cytokines involved in the adipocyte formation such as the adipokines leptin (*LEP*) and adiponectin (*ADIPOQ*) and the myokine implicated in the blocking of the muscle formation *Myostatin (Mstn)* (Hoggard *et al.*, 1997; Fu and Luo, 2005; Rodgers and Garikipati, 2008) was analyzed. Two muscles: *longissimus thoracis (LT)* and *masseter (MS)*, and two breeds (Pirenaica and Friesian) were sampled in order to study the muscle and breed effect in the expression of the genes selected.

As in Studies I and II, in order to obtain a better understanding of the gene expression data, the study of the variability of the expression of the genes related to fibrogenesis, myogenesis and adipogenesis was performed.

## **2. RESULTS**

### **2.1. Chemical traits**

The total and soluble collagen contents in the *LT* and *MS* muscles for the four Pirenaica and the four Friesian bulls were measured (Table 7.1). The Pirenaica bulls had  $11.94 \pm 0.93$  months of age and carcass average weight of  $323 \pm 18.00$  kg, while the Friesian bulls age was  $9.73 \pm 0.05$  months and their carcass average weight  $242 \pm 11.60$  kg.

Regarding the total and soluble collagen comparison, no statistically differences were found between *LT* and *MS* muscles for the two breeds studied ( $P > 0.05$ ) (Table 7.1). As previously shown, Pirenaica bulls presented a higher IMF content in the *MS* than in the *LT* muscle while Friesian bulls did not show statistically significant differences between both muscles in IMF measured (Table 7.1).

**Table 7.1.** Mean values, standard errors and *P*-value for the comparison of *longissimus thoracis* and *masseter* muscles in Pirenaica and Friesian bulls of descriptive parameters considered for the chemical traits measured.

	Pirenaica				Friesian			
	<i>LT</i>	<i>MS</i>	SEM	<i>P</i> value	<i>LT</i>	<i>MS</i>	SEM	<i>P</i> value
Fat, %	1.30	3.23	0.47	0.023	3.27	4.83	0.52	0.152
Total Collagen <sup>2</sup>	4.30	4.90	0.60	0.652	5.55	6.49	0.40	0.272
Soluble Collagen <sup>3</sup>	17.85	17.68	0.63	0.901	16.66	18.47	1.23	0.506

<sup>1</sup> *LT*= *Longissimus thoracis*; *MS*= *Masseter*

<sup>2</sup> mg /g

<sup>3</sup> % of total collagen.

Regarding breed comparison, the results obtained in the present study for the total and soluble collagen analysis in *LT* and *MS* muscles of Pirenaica and Friesian bulls are shown in Table 7.2. Both total and soluble collagen, presented similar values ( $P > 0.05$ ).

As discussed in the Study II, the *LT* muscle in Pirenaica bulls presented less fat percentage than in Friesian bulls ( $P < 0.05$ ) whereas the IMF content in *MS* muscle did not differ statistically between the two breeds studied (Table 7.2).

**Table 7.2.** Mean values, standard errors and *P*-value for the comparison of *longissimus thoracis* and *masseter* muscles between Pirenaica and Friesian bulls of descriptive parameters considered for the chemical traits measured.

	<i>LT</i> <sup>1</sup>				<i>MS</i>			
	Pirenaica	Friesian	SEM	<i>P</i> -value	Pirenaica	Friesian	SEM	<i>P</i> -value
Fat, %	1.30	3.27	0.44	0.007	3.23	4.83	0.57	0.183
Total Collagen <sup>2</sup>	4.30	5.55	0.52	0.265	4.90	6.49	0.59	0.200
Soluble Collagen <sup>3</sup>	17.85	16.66	0.70	0.437	17.68	18.47	1.17	0.763

<sup>1</sup>*LT*= *Longissimus thoracis*; *MS*= *Masseter*

<sup>2</sup> mg/g

<sup>3</sup> % of total collagen

## 2.2. Gene expression

With the aim of determining if there were differences in gene expression between muscles of each breed separately, *LT* and *MS* muscles in Pirenaica and Friesian bulls were compared using the MIXED model. The results showed a significantly higher expression of *MyoD* gene in *LT* muscle compared to *MS* ( $P < 0.001$ ) in both Pirenaica and Friesian bulls, was measured. In Friesian bulls, the genes *Mstn* and *Zfp423* were expressed at a higher rate in *LT* muscle than in *MS* ( $P < 0.001$  and  $P < 0.05$  respectively). On the contrary, the gene *ADIPOQ* presented a higher expression in *MS* muscle compared with *LT* ( $P < 0.05$ ) (Table 7.3).

When comparing each muscle by breed, *LT* and *MS* muscles showed an increased expression of *Mstn* gene ( $P < 0.05$  and  $P < 0.001$  respectively) in Pirenaica breed compared to Friesian bulls. In *MS* muscle, Pirenaica bulls presented a higher expression of *Myf5* ( $P < 0.05$ ). The rest of the genes studied presented a similar expression between both breeds (Table 7.4).

**Table 7.3.** Differences in normalised -expression values in *longissimus thoracis* and *masseter* muscles for Pirenaica and Friesian bulls.

Gene	Contrast	Pirenaica			Friesian			
		DIF <sup>1</sup>	SEM	P-value	Contrast	DIF	SEM	P-value
<i>FN1</i> <sup>2</sup>	<i>LT-MS</i> <sup>3</sup>	-0.25	0.35	0,481	<i>LT-MS</i>	0.33	0.47	0,492
<i>FGFR1</i>	<i>LT-MS</i>	0.12	0.33	0,725	<i>LT-MS</i>	-0.12	0.44	0,778
<i>FGF2</i>	<i>LT-MS</i>	0.45	0.42	0,281	<i>LT-MS</i>	0.59	0.47	0,213
<i>TGFB1</i>	<i>LT-MS</i>	-0.27	0.23	0,245	<i>LT-MS</i>	-0.16	0.41	0,697
<i>Myf5</i>	<i>LT-MS</i>	-0.40	0.62	0,516	<i>LT-MS</i>	-0.18	0.47	0,711
<i>MyoG</i>	<i>LT-MS</i>	0.06	0.47	0,902	<i>LT-MS</i>	0.51	0.40	0,198
<i>MyoD</i>	<i>LT-MS</i>	2.45	0.51	0,000	<i>LT-MS</i>	1.98	0.41	0,000
<i>LEP</i>	<i>LT-MS</i>	0.63	0.80	0,438	<i>LT-MS</i>	0.26	0.76	0,734
<i>ADIPOQ</i>	<i>LT-MS</i>	0.03	0.50	0,952	<i>LT-MS</i>	-1.18	0.57	0,042
<i>Mstn</i>	<i>LT-MS</i>	1.63	0.94	0,090	<i>LT-MS</i>	2.12	0.59	0,001
<i>Zfp423</i>	<i>LT-MS</i>	0.44	0.28	0,118	<i>LT-MS</i>	0.81	0.39	0,044

<sup>1</sup>DIF contrasted differences between normalized  $\log_2$  ( $E^{-Cq}$ ).

<sup>2</sup>*FN1*: Fibronectin; *FGFR1*= Fibroblast growth factor receptor 1; *FGF2*= Fibroblast growth factor 2; *TGFB1*= Transforming growth factor  $\beta$  1; *Myf5*= Myogenic factor 5; *MyoG*= Myogenin; *MyoD*= Myogenic differentiation 1; *LEP*= Leptin; *ADIPOQ*= Adiponectin; *Mstn* = Myostatin, *Zfp423*= Zinc finger protein 423.

<sup>3</sup>*LT*= *Longissimus thoracis*; *MS*= *Masseter*

**Table 7.4.** Differences in normalized expression values in *longissimus thoracis* for Pirenaica and Friesian bulls.

<i>LT</i> <sup>1</sup>					<i>MS</i>			
Gene	Contrast	DIF <sup>2</sup>	SEM	<i>P</i> value	Contrast	DIF	SEM	<i>P</i> value
<i>FNI</i> <sup>3</sup>	Pir-Fri <sup>4</sup>	-0.51	0.56	0.358	Pir-Fri	0.09	0.34	0.801
<i>FGFR1</i>	Pir-Fri	-0.39	0.52	0.454	Pir-Fri	-0.61	0.32	0.066
<i>FGF2</i>	Pir-Fri	0.21	0.48	0.670	Pir-Fri	0.36	0.50	0.479
<i>TGFB1</i>	Pir-Fri	-0.19	0.44	0.667	Pir-Fri	-0.08	0.32	0.813
<i>Myf5</i>	Pir-Fri	-0.92	0.72	0.205	Pir-Fri	-0.69	0.33	0.043
<i>MyoG</i>	Pir-Fri	-0.58	0.55	0.267	Pir-Fri	-0.13	0.31	0.688
<i>MyoD</i>	Pir-Fri	0.05	0.54	0.925	Pir-Fri	-0.42	0.32	0.191
<i>LEP</i>	Pir-Fri	-0.12	0.89	0.896	Pir-Fri	-0.46	0.74	0.534
<i>ADIPOQ</i>	Pir-Fri	0.80	0.65	0.222	Pir-Fri	-0.44	0.48	0.368
<i>Mstn</i>	Pir-Fri	2.37	0.92	0.013	Pir-Fri	2.86	0.66	0.000
<i>Zfp423</i>	Pir-Fri	-0.25	0.46	0.588	Pir-Fri	0.09	0.32	0.772

<sup>1</sup>LT= *Longissimus thoracis*; MS= *Masseter*

<sup>2</sup>DIF contrasted differences between normalized log<sub>2</sub> (E<sup>ca</sup>).

<sup>3</sup>*FNI*: Fibronectin; *FGFR1*= Fibroblast growth factor receptor 1; *FGF2*= Fibroblast growth factor 2; *TGFB1*= Transforming growth factor β 1; *Myf5*= Myogenic factor 5; *MyoG*= Myogenin; *MyoD*= Myogenic differentiation 1; *LEP*= Leptin; *ADIPOQ*= Adiponectin; *Mstn* = Myostatin, *Zfp423*= Zinc finger protein 423.

<sup>4</sup>Fri=Friesian; Pir=Pirenaica



### **2.3. Variability analysis**

A total of 48 readings for each gene, muscle and breed analyzed resulted from the NESTED analysis applied in the current work (4 animals x 3 samples x 2 RTs, 2 qPCRs).

Mean Cqs for each gene as well as the estimated standard deviations of the different factors that affect to the experiment and total noise obtained from the variability analysis of the *LT* and *MS* muscles in Pirenaica and Friesian bulls are included in Tables 7.5-7.7.

All the CV values were below the 11% (Tables 7.5-7.7). Due to the fact that the number of wells available in the qPCR plates is limited, the analysis of the genes of interest and their corresponding reference genes were divided into three groups: genes related to fibrogenesis (*FN1*, *FGFR1*, *FGF2* and *TGFB1*), genes related to myogenesis (*Myf5*, *MyoD* and *MyoG*) and the cytokines *LEP*, *ADIPOQ*, *Mstn* plus the involved on the adipocyte formation process *Zfp423*. The contribution of the processing steps to the variance was also expressed as percentages to facilitate the comprehension of the results (Figures 7.1-7.3).

**Table 7.5.** Mean, Minimum, maximum, and CV of the Cq values, estimated standard deviations for inter-animal variation, processing steps (Sampling, RT and qPCR) and total variance for fibrogenic genes *FNI*, *FGFR1*, *FGF2* and *TGFB1* in *longissimus thoracis* (A) and *masseter* (B) muscles of Pirenaica and Friesian bulls.

A	Pirenaica						Friesian					
	Item	<i>FNI</i> <sup>1</sup>	<i>FGFR1</i>	<i>FGF2</i>	<i>TGFB1</i>	<i>ACTB</i>	<i>TOP2B</i>	<i>FNI</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGF2</i>	<i>TGFB1</i>	<i>ACTB</i>
Mean Cq	22.63	24.62	30.86	26.29	20.98	24.14	22.74	24.85	31.61	26.54	21.46	24.93
Minimum Cq	20.44	22.90	28.04	24.94	19.95	22.95	20.04	22.06	28.86	23.39	19.06	22.14
Maximum Cq	24.81	27.42	32.59	27.58	22.07	26.68	25.34	27.33	33.74	28.46	23.17	27.58
CV (%)	4.62	4.02	3.68	2.61	2.53	1.74	5.56	4.90	3.80	4.29	5.64	5.83
$\hat{\sigma}$												
Animal	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.26	0.00	0.69	1.17
Sampling	1.12	0.95	0.00	0.51	0.39	0.28	1.37	1.04	0.96	0.93	0.66	0.99
RT	0.37	0.47	1.18	0.40	0.28	0.10	0.47	0.49	0.61	0.41	0.46	0.41
qPCR	0.24	0.20	0.37	0.26	0.17	0.30	0.17	0.14	0.40	0.24	0.49	0.14
Total	1.20	1.08	1.24	0.70	0.51	0.42	1.46	1.26	1.23	1.05	1.17	1.59
B	Pirenaica						Friesian					
	Item	<i>FNI</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGF2</i>	<i>TGFB1</i>	<i>ACTB</i>	<i>TOP2B</i>	<i>FNI</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGF2</i>	<i>TGFB1</i>	<i>ACTB</i>
Mean Cq	22.37	24.73	31.24	25.93	21.02	24.02	21.16	22.81	30.30	24.56	19.87	22.49
Minimum Cq	21.64	24.08	27.44	24.97	20.19	23.46	19.09	20.79	27.98	23.00	18.25	20.93
Maximum Cq	23.19	25.38	33.59	27.07	22.64	24.61	23.37	24.43	32.65	26.22	21.91	24.02
CV (%)	1.66	1.50	5.16	1.72	2.15	1.38	4.99	4.38	4.25	3.91	4.15	4.32
$\hat{\sigma}$												
Animal	0.00	0.17	0.51	0.00	0.26	0.17	0.73	0.62	0.82	0.45	0.46	0.51
Sampling	0.10	0.14	0.00	0.30	0.61	0.20	0.66	0.58	0.81	0.68	0.20	0.79
RT	0.37	0.20	1.59	0.30	0.40	0.17	0.67	0.61	0.69	0.49	0.44	0.41
qPCR	0.17	0.24	0.42	0.24	0.17	0.14	0.17	0.10	0.24	0.33	0.41	0.10
Total	0.42	0.39	1.72	0.49	0.79	0.35	1.21	1.05	1.37	1.00	0.78	1.03

<sup>1</sup>*FNI*= Fibronectin; *FGFR1*= Fibroblast growth factor receptor 1; *FGF2*= Fibroblast growth factor 2; *TGFB1*= Transforming growth factor  $\beta$  1, *ACTB* =  $\beta$  actin; *TOP2B* = Topoisomerase II-beta.

**Table 7.6.** Mean, Minimum, maximum, and CV of the Cq values, estimated standard deviations for inter-animal variation, processing steps (Sampling, RT and qPCR) and total variance for myogenic genes *Myf5*, *MyoD* and *MyoG* in *longissimus thoracis* (A) and *masseter* (B) muscles of Pirenaica and Friesian bulls.

A		Pirenaica					Friesian				
Item	<i>Myf5</i> <sup>1</sup>	MYOD	MYOG	ACTB	TOP2B	<i>Myf5</i>	MYOD1	MYOG	ACTB	TOP2B	
Mean Cq	27.63	25.72	24.88	21.04	24.28	27.59	26.44	24.96	21.58	25.43	
Minimum Cq	25.83	23.76	23.28	19.92	23.06	24.99	24.00	23.08	19.26	23.20	
Maximum Cq	33.71	29.07	27.69	25.06	29.46	29.82	27.61	26.26	23.18	27.52	
CV (%)	5.79	1.75	2.49	3.55	5.50	4.51	3.66	3.45	5.04	4.76	
$\hat{\sigma}$											
Animal	1.26	0.22	0.50	0.00	0.61	0.00	0.00	0.31	0.05	0.42	
Sampling	1.10	0.30	0.24	0.62	1.22	1.14	0.74	0.70	0.91	0.93	
RT	0.36	0.17	0.26	0.36	0.30	0.49	0.85	0.46	0.41	0.67	
qPCR	0.28	0.20	0.14	0.17	0.14	0.50	0.24	0.10	0.14	0.28	
Total	1.73	0.45	0.62	0.74	1.40	1.04	1.15	0.90	1.01	1.25	
B		Pirenaica					Friesian				
Item	<i>Myf5</i>	MYOD	MYOG	ACTB	TOP2B	<i>Myf5</i>	MYOD1	MYOG	ACTB	TOP2B	
Mean Cq	27.03	27.77	24.53	20.93	23.85	25.41	26.41	23.48	20.02	22.81	
Minimum Cq	26.28	26.65	23.85	20.14	23.24	23.15	24.75	21.68	18.43	21.04	
Maximum Cq	28.03	28.78	25.33	22.01	25.00	27.25	28.65	25.22	21.48	24.92	
CV (%)	1.60	2.07	1.40	1.86	1.37	4.45	3.81	4.48	3.85	4.57	
$\hat{\sigma}$											
Animal	0.22	0.50	0.17	0.00	0.00	0.00	0.46	0.35	0.00	0.00	
Sampling	0.30	0.24	0.28	0.30	0.17	0.74	0.41	0.61	0.51	0.62	
RT	0.17	0.26	0.10	0.17	0.24	0.85	0.81	0.82	0.50	0.75	
qPCR	0.20	0.14	0.10	0.17	0.10	0.24	0.16	0.11	0.15	0.48	
Total	0.45	0.62	0.36	0.37	0.33	1.15	1.04	1.08	0.73	1.08	

<sup>1</sup> *Myf5*= Myogenic factor 5; *MyoD*= Myogenic differentiation 1; *MyoG*= Myogenin; ACTB =  $\beta$  actin; TOP2B = Topoisomerase II-beta.

**Table 7.7.** Mean, Minimum, maximum, and CV of the Cq values, estimated standard deviations for inter-animal variation, processing steps (Sampling, RT and qPCR) and total variance for genes *LEP*, *ADIPOQ*, *Mstn* and *Zfp423* in *longissimus thoracis* (A) and *masseter* (B) muscles of Pirenaica and Friesian bulls.

A		Pirenaica					Friesian					
Item	<i>LEP</i> <sup>1</sup>	<i>ADIPOQ</i>	<i>Mstn</i>	<i>ZfpP423</i>	<i>ACTB</i>	<i>TOP2B</i>	<i>LEP</i>	<i>ADIPOQ</i>	<i>Mstn</i>	<i>ZFFP423</i>	<i>ACTB</i>	<i>TOP2B</i>
Mean Cq	30.84	25.06	30.22	24.22	21.14	24.04	31.49	25.43	33.53	24.62	21.54	25.10
Minimum Cq	26.28	21.24	26.12	22.33	18.42	22.45	28.25	22.40	29.87	22.36	18.98	22.15
Maximum Cq	36.07	32.49	36.12	25.88	25.02	25.07	36.71	29.64	36.18	26.06	23.55	27.32
CV (%)	7.21	2.16	9.09	3.58	5.31	2.94	6.23	6.51	4.57	3.75	5.80	5.49
$\hat{\sigma}$												
Animal	0.00	0.00	0.00	0.73	0.14	0.39	0.79	0.00	0.92	0.28	0.00	0.36
Sampling	2.00	0.35	2.88	0.26	0.87	0.32	1.41	1.07	0.96	0.70	1.06	1.28
RT	0.63	0.40	0.57	0.48	0.55	0.52	0.47	1.48	0.32	0.55	0.58	0.50
qPCR	0.54	0.14	0.65	0.17	0.14	0.14	0.62	0.22	0.77	0.14	0.14	0.20
Total	2.16	0.54	3.00	0.93	1.04	0.74	1.80	1.84	1.57	0.95	1.22	1.44
B		Pirenaica					Friesian					
Item	<i>LEP</i> <sup>1</sup>	<i>ADIPOQ</i>	<i>Mstn</i>	<i>ZfpP423</i>	<i>ACTB</i>	<i>TOP2B</i>	<i>LEP</i>	<i>ADIPOQ</i>	<i>Mstn</i>	<i>ZFFP423</i>	<i>ACTB</i>	<i>TOP2B</i>
Mean Cq	31.45	24.99	31.81	24.38	20.87	23.84	29.75	24.04	33.51	23.32	19.89	22.53
Minimum Cq	28.03	22.19	29.45	23.09	19.31	22.35	26.65	20.48	30.92	21.93	18.09	21.02
Maximum Cq	36.09	27.46	36.39	25.28	22.11	24.85	34.49	31.63	37.19	25.41	21.45	24.42
CV (%)	5.54	5.98	5.39	2.10	2.72	2.32	6.69	11.99	5.10	3.60	3.82	4.05
$\hat{\sigma}$												
Animal	0.88	1.19	1.26	0.00	0.00	0.00	1.65	1.34	0.79	0.47	0.24	0.48
Sampling	1.03	1.07	1.05	0.35	0.20	0.35	1.32	0.00	1.21	0.62	0.60	0.78
RT	0.57	0.24	0.32	0.40	0.45	0.40	0.24	2.77	0.00	0.37	0.22	0.28
qPCR	0.63	0.17	0.74	0.14	0.20	0.17	0.51	0.24	1.09	0.14	0.14	0.10
Total	1.61	1.62	1.82	0.54	0.53	0.57	2.19	3.09	1.81	0.88	0.70	0.96

<sup>1</sup> *LEP*= Leptin; *ADIPOQ*= Adiponectin; *Mstn* = Myostatin; *Zfp423*= Zinc finger protein 423; *ACTB* =  $\beta$  actin; *TOP2B* = Topoisomerase II-beta.

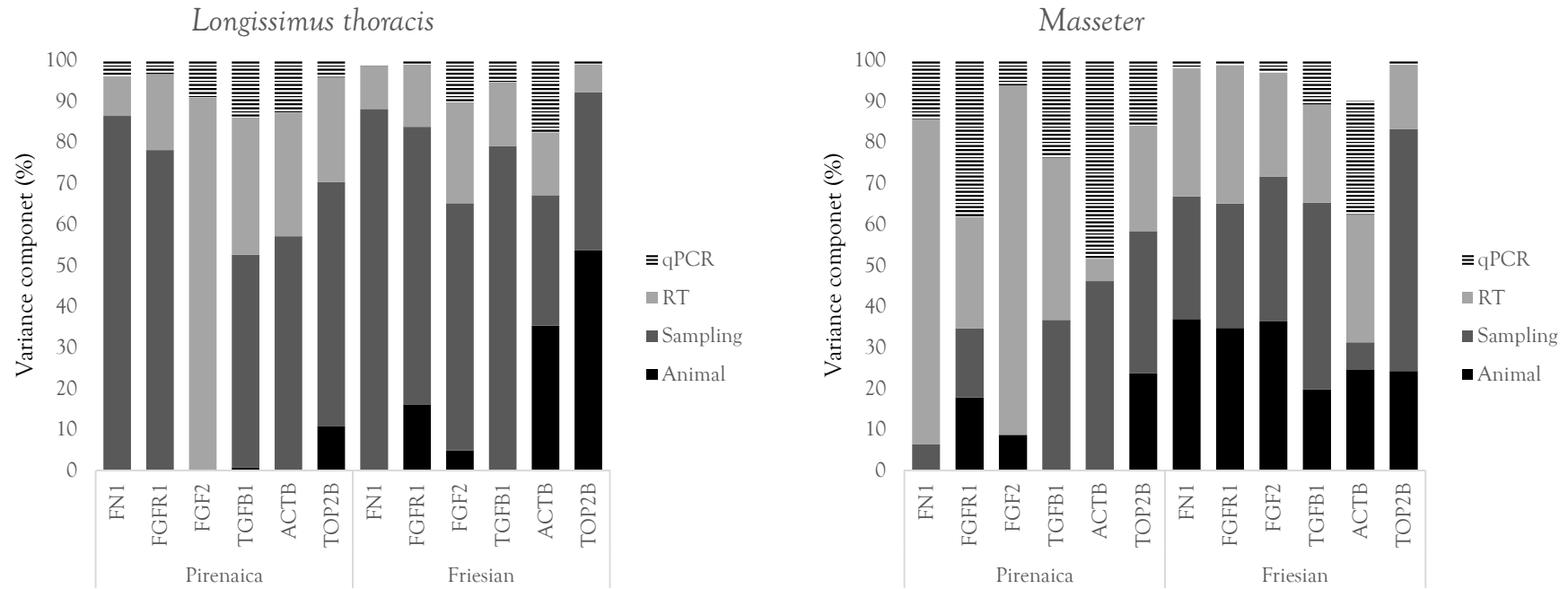
Considering the genes involved in the fibrogenesis (*FN1*, *FGFR1*, *FGF2* and *TGFB1*), the gene *FGF2* presented the higher Cq values, that ranged from 30.30 to 31.61 cycles, in both breeds and both muscles (Table 7.5). The inter-animal variation expressed by the factor “animal” was lower than the variance contributions presented by the rest of the processing steps. The sum of sampling and RT represented, on average, the 78.66% and 66.44% of the total variance in *LT* and *MS* muscles respectively and the qPCR variance was low in most of cases.

For the genes related to muscle formation (*Myf5*, *MyoD* and *MyoG*) the Cq values were similar and ranged from 24.53 to 27.77 cycles. In that genes, the animal and qPCR steps denoted a low variability while the sum of sampling and RT displayed, the 66.95% in *LT* and 75.47% and in *MS* muscle (Table 7.6).

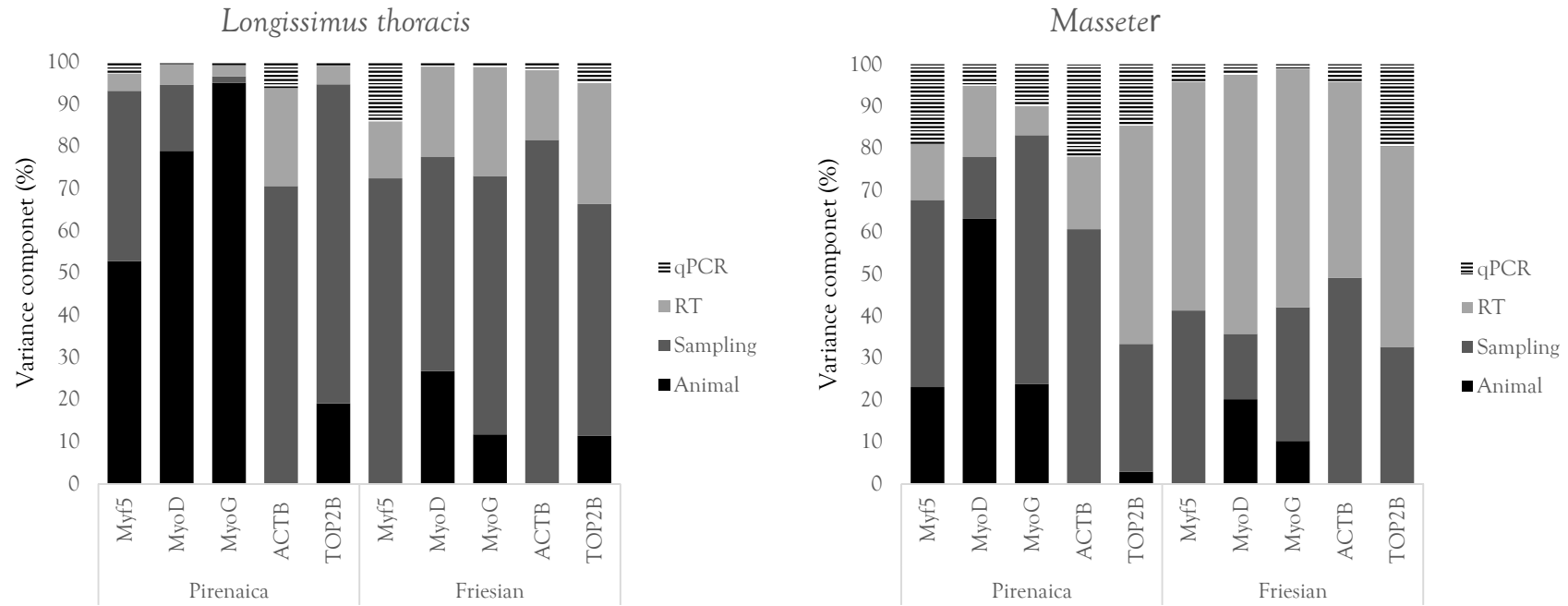
In the last group of genes that included the cytokines (*LEP*, *ADIPOQ*, *Mstn*) and the adipogenic gene *Zfp423* the results showed that the Cq in *ADIPOQ* and *Mstn* genes were higher (30.22-33.53 cycles) than in *LEP* and *Zfp423* which presented a Cq values between 24.22 and 25.06 cycles (Table 7.7). The total variance presented by the cytokines *LEP*, *ADIPOQ*, *Mstn* seemed to be higher than in the other genes studied. The variance contributions of the processing steps sampling and RT was higher than the rest of the steps representing together the 81.40% of the total variance in the case of *LT* muscle and 66.41% in the *MS* muscle in both breeds.

Taking into account all the genes studied in both muscles in the Pirenaica and Friesian bulls, the sampling and RT represented the 73% of the total variance.

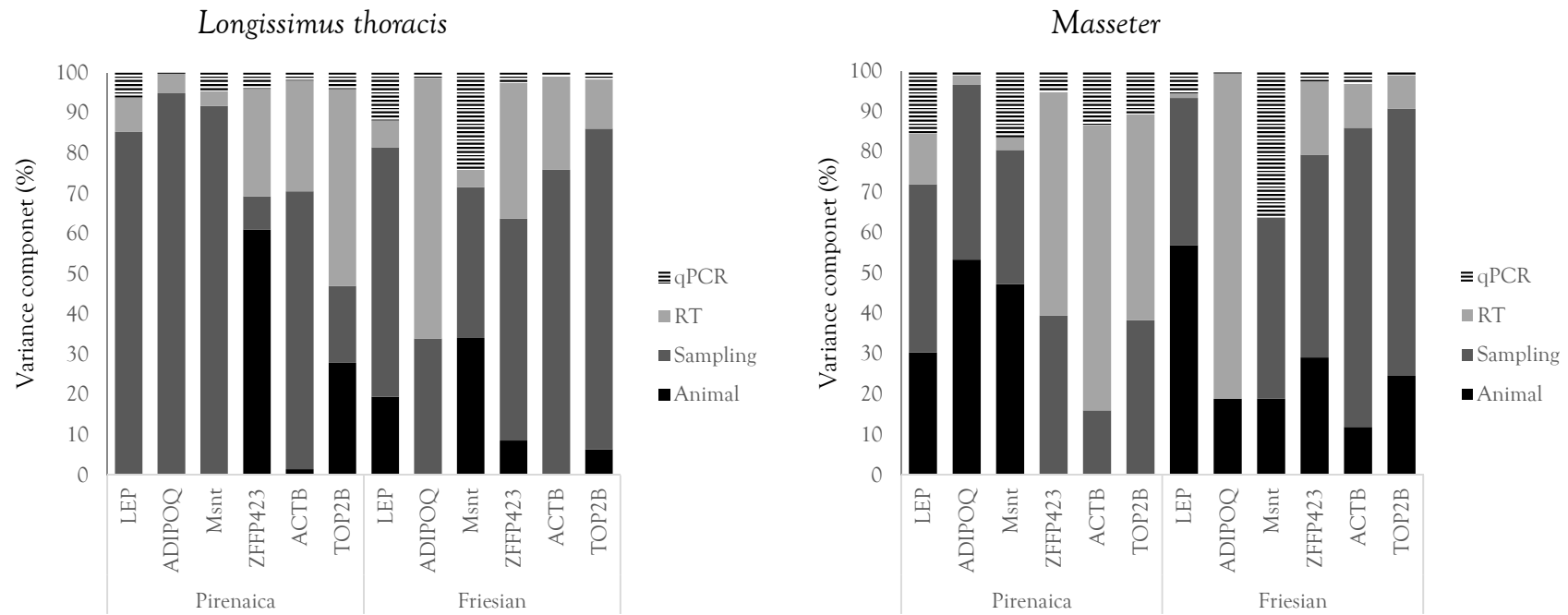
.



**Figure 7.1.** Standard deviations contributing for the sampling-processing steps expressed as percentages in *FN1*, *FGFR1*, *FGF2*, *TGFβ1*, *ACTB* and *TOP2B* genes of *longissimus thoracis* and *masseter* muscles in Pirenaica and Friesian bulls. *FN1*= Fibronectin; *FGFR1*= Fibroblast growth factor receptor 1; *FGF2*= Fibroblast growth factor 2; *TGFβ1*= Transforming growth factor β 1; *ACTB* = β actin; *TOP2B* = Topoisomerase II-beta.



**Figure 7.2.** Standard deviations contributing for the sampling-processing steps expressed as percentages in *Myf5*, *MyoD*, *MyoG*, *ACTB* and *TOP2B* genes of *longissimus thoracis* and *masseter* muscles in Pirenaica and Friesian bulls. *Myf5*= Myogenic factor 5; *MyoD*= Myogenic differentiation 1; *MyoG*= Myogenin; *ACTB* =  $\beta$  actin; *TOP2B* = Topoisomerase II-beta.



**Figure 7.3.** Standard deviations contributing for the sampling-processing steps expressed as percentages in *LEP*, *ADIPOQ*, *Mstn*, *Zfp423*, *ACTB* and *TOP2B* genes of *longissimus thoracis* and *masseter* muscle in Pirenaica and Friesian bulls. *LEP*= *Leptin*; *ADIPOQ*= *Adiponectin*; *Mstn* = *Myostatin*; *Zfp423*= *Zinc finger protein 423*; *ACTB* =  *$\beta$  actin*; *TOP2B* = *Topoisomerase II-beta*.



### 3. DISCUSSION

Muscle cells, adipocytes, and fibroblasts are derived from the same pool of mesenchymal progenitor cells (MSCs), which are abundant in the skeletal muscle at early developmental stages and are still present at significant levels in mature muscle (Du *et al.*, 2010). The skeletal muscle development during the prenatal stage mainly involves the formation of muscle fibers (myogenesis), but a significant portion of MSCs differentiate into fibro/adipogenic progenitor cells committing to both adipocytes (adipogenesis) and fibroblasts (fibrogenesis) (Joe *et al.*, 2010; Uezumi *et al.*, 2010, Uezumi *et al.*, 2011) that diverge early during the development (Duarte *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2013). As a result, myogenesis, intramuscular adipogenesis and fibrogenesis may be considered as a competitive process in the tissue formation, providing that the total density and proliferation of progenitor cells are unaltered. (Du *et al.*, 2013).

In spite of the IMF differences found between the Pirenaica and Friesian *LT* muscle (Table 7.4), the expression of the adipogenic factor *Zfp423* was similar. This transcription factor has been identified as a key factor responsible of early commitment of adipogenesis (Gupta *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012) thus is expressed in the early phases of the adipocyte formation. On the contrary, the *Zfp423* expression was higher in the *LT* muscle of Friesian bulls compared with the *MS* muscle (Table 7.3) suggesting a higher early adipogenesis in that muscle.. Similarly, Martins *et al.* (2015) reported no differences between the *Zfp423* expression in *longissimus* muscle of Angus and Nellore bulls with distinct IMF content and suggested that, since the gene is related to preadipocyte differentiation, the observed IMF differences had no relation with the enhanced commitment of undifferentiated cells to the adipogenic lineage.

Similarly to IMF, intramuscular collagen content synthesized by the fibroblasts is also reported as an important factor of beef quality because it directly affects meat tenderness (Martins *et al.*, 2015). Low total collagen content and high percentage of soluble collagen has been associated with high tenderness in studies performed in *longissimus* muscle of beef cattle (Berry *et al.* 1974). As described previously, intramuscular adipocytes and fibroblasts develop from common progenitor cells (Joe *et al.*, 2010; Uezumi *et al.*, 2010; Uezumi *et al.*, 2011). Intramuscular adipogenesis and fibrogenesis may occur

simultaneously leading to an enhancement of both intramuscular fat and collagen deposition in skeletal muscle (Duarte *et al.*, 2013) however, animals with different IMF content might present similar total collagen as shown by Martins *et al.* (2015) in the *longissimus* muscle in Angus and Nellore cattle. Likewise, in the current work, no differences were found in the total and soluble collagen measured ( $P > 0.05$ ) in the muscles and breeds studied (Table 7.1). Collagen synthesis is mainly mediated by *TGF $\beta$*  signaling pathway (Chen *et al.*, 2005, Salvadori *et al.*, 2005) which in turn induces the expression of fibrogenic genes, including the *FN1* (Kennedy *et al.*, 2008). Therefore, the lack of differences for both total and soluble collagen content between the *LT* and *MS* muscles for Pirenaica and Friesian breeds was consistent with the similar expression of the *TGF $\beta$ 1* and *FN1* gene on the muscles and breeds referred.

Regarding the expression of the genes involved in the muscle formation, the *LT* and *MS* muscles in the two breeds studied presented a similar expression of *Myf5* and *MyoG* genes. However, *MyoD* had a higher expression in the *LT* muscle of both breeds compared with *MS*. The myogenesis process is under the control of the myogenic regulatory factors (MRFs), which are expressed in a hierarchical and coordinated way for the commitment of myogenic precursor cells and the terminal differentiation of myoblasts (Francetic and Li, 2011). *Myf5* is the earliest gene expressed in the determination of muscle cells and is closely followed by *MyoD*. Both genes function compensatively inducing the differentiation of precursor cells into myoblasts (Roth *et al.*, 2003) and their expression levels of decrease progressively after the induction of the differentiation of the muscular cells. On the other hand, the gene *MyoG* acts downstream of *MyoD* and *Myf5* in skeletal muscle differentiation of cattle (Singh and Dilworth, 2013), taking part in the fusion of myoblasts into myotubes (Rawls *et al.*, 1995; Barnoy and Kosower, 2007) thus its expression increases with the muscle cells differentiation. Therefore, the results obtained might indicate that early proliferation of myoblasts is taking place in the *LT* muscle of Pirenaica and Friesian bulls, in accordance with a greater development of muscle fibers in that muscle.

The *Mstn* is critically important for muscle development (McPherron and Lee, 1997) due to its role in reducing muscle fiber formation (Rios *et al.*, 2002), and its mutation

consistently results in 'double muscling' in cattle (McPherron and Lee, 1997). It is the best characterized myokine in cattle (Albrecht *et al.*, 2017) and different studies have shown that it also has effects on other tissues. Although it has been observed that *Mstn* can promote the adipogenesis in MSCs (Kim *et al.*, 2001; Hiari *et al.*, 2006; Pantoja *et al.*, 2008), its effects on adipogenesis are yet controversial and much is yet to elucidate about its role in the development of the adipose tissue.

The results obtained in the current work show that the *Mstn* expression was higher in *LT* muscle than in *MS* in Friesian bulls. As mentioned above, there was also a higher expression of the factor *Zpf423* in *MS* muscle in Friesian. Taking into consideration that *Mstn* expression was also higher in Pirenaica bulls than in Friesian, in both muscles studied, and that, as reported in Chapter 6, *PPARG* expression was as well higher in both muscles in Pirenaica animals, those results together seem to suggest the involvement of that myokine in the onset of early adipogenesis. On the other hand, *Mstn* could be affecting as well the myogenic precursor cells, as the higher expression of *Myf5*, a factor involved in the early myogenic events, in the *MS* muscle in Friesian bulls compared to Pirenaica bulls, would agree with a lower expression of *Mstn* in that muscle. Nevertheless the higher expression of both *MyoD* and *Mstn* in *LT* muscle vs *MS* in Friesian bulls remains elusive, as *Mstn* negatively regulates this MRF expression in muscle (Hennebry *et al.*, 2009).

Muscle cells and adipocytes secrete hormone-like substances, called myokines and adipokines respectively, which can serve as signal molecules or as promoters or inhibitors for growth and development of other cells (Trayhurn *et al.*, 2011). Adipokines and myokines are often involved in complex regulatory pathways on a local or systemic level and, therefore, are of great interest. In the present work, apart from the previously mentioned *Mstn*, the expression of the adipokines *ADIPOQ* and *LEP* was studied. The expression of *ADIPOQ* and *LEP* has been reported to be positively related with IMF content or marbling in cattle (Wang *et al.*, 2009; Graugnard *et al.*, 2009). The *ADIPOQ* stimulates fatty acids oxidation, decreases plasma triglycerides and is important for fatty acid mobilization (Bełtowski, 2003; Nakamura *et al.*, 2014). The *LEP* gene plays a major role in the regulation of energy intake and expenditure (Hwang *et al.*, 1997). Also, it can

alter the level of circulating glucocorticoids (DeVos *et al.*, 1998) and has autocrine effects on adipose tissue, so that adipocytes that accumulate large amounts of lipids can synthesize *LEP* preventing this accumulation from continuing (Fruhbeck *et al.*, 2001). In the current work, there were no differences in *LEP* gene expression for *LT* and *MS* muscles in Pirenaica and Friesian bulls but the higher expression of the *ADIPOQ* gene in the *MS* muscle compared with *LT* muscles of Friesian bulls might indicate that the fatty acid oxidation and mobilization could be more active in that muscle at the moment of the slaughter.

Define the experimental procedures, the control groups, the type and number of replicates, the experimental conditions, and the sample handling methods within each group is essential to minimize variability (Taylor *et al.*, 2010). The results obtained from the variability study performed denoted that the steps sampling and RT presented the higher variability (73%) in all the genes studied for *LT* and *MS* muscles in Pirenaica and Friesian bulls. On the other hand, the contribution of the final processing step qPCR was lower than the rest of the steps so it showed the highest repeatability. Although for the factor animal the variability was smaller compared with the factors sampling, RT and qPCR, it was the most difficult to estimate due to the low number of animals sampled in the present study. It should be notice that the variability results obtained in the present study for genes involved in the fibrogenesis, miogenesis and adipogenesis in both breeds and muscles, were similar to the reported in the Study II for adipogenic genes in *LT* and *MS* muscles of Pirenaica and Friesian bulls and in the Study I for adipogenic genes in *LT*, *semitendinosus* (*ST*), *MS* and *sternomandibularis* (*SM*) muscles of Pirenaica bulls. In addition, those results agreed with the suggestion made by other authors who highlighted the importance of taking more than a single sample per tissue and recommended the use of samples replicates preferentially to any other replicates when working with solid tissues (Cruz *et al.*, 2014; Tichopad *et al.*, 2009). Minimising the experiment variability would contribute to a better interpretation of the results and an efficiently detection of the changes in genes expression. Therefore, attending to the results presented in the present work, it should be recommended the inclusion of sample and RT replicates in the design of future experiments preferably to any other replicates.

#### 4. REFERENCES

- Albrecht E, Gotoh T, Ebara F, Xu JX, Viergutz T, Nurnberg G, *et al.* Cellular conditions for intramuscular fat deposition in Japanese Black and Holstein steers. *Meat Sci.* 2011;89(1):13-20. 10.1016/j.meatsci.2011.03.012.
- Albrecht E, Schering L, Liu Y, Komolka K, Kühn C, Wimmers K, *et al.* Triennial Growth and Development Symposium: Factors influencing bovine intramuscular adipose tissue development and cellularity1. *J Anim Sci.* 2017;95(5):2244-54. 10.2527/jas.2016.1036.
- Barnoy S, Kosower NS. Calpastatin in rat myoblasts: transient diminution and decreased phosphorylation depend on myogenin-directed myoblast differentiation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):253-61. 10.1016/j.biocel.2006.08.008.
- Beltowski J. Adiponectin and resistin—new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit.* 2003;9(2):RA55-61.
- Berkes CA, Tapscott SJ. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2005;16(4-5):585-95. 10.1016/j.semcdb.2005.07.006.
- Berry B, Smith G, Carpenter Z. Relationships of certain muscle, cartilage and bone traits to tenderness of the beef longissimus. *J Food Sci.* 1974;39(4):819-24.
- Chen YW, Nagaraju K, Bakay M, McIntyre O, Rawat R, Shi R, *et al.* Early onset of inflammation and later involvement of TGFbeta in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2005;65(6):826-34.10.1212/01.wnl.0000173836.09176.c4.
- Cruz GD, Wang Y, Fadel JG. Technical note: Alternatives to reduce adipose tissue sampling bias. *J Anim Sci.* 2014;92(10):4761-6. 10.2527/jas.2014-8180.
- DeVos P, Lefebvre AM, Shrivu I, Fruchart JC, Auwerx J. Glucocorticoids induce the expression of the leptin gene through a non-classical mechanism of transcriptional activation. *Eur J Biochem.* 1998;253:619-26.
- Du M, Tong J, Zhao J, Underwood KR, Zhu M, Ford SP, *et al.* Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *J Anim Sci.* 2010;88(13 Suppl):E51-60. 10.2527/jas.2009-2311.
- Du M, Huang Y, Das AK, Yang Q, Duarte MS, Dodson MV, *et al.* Meat Science and Muscle Biology Symposium: manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. *J Anim Sci.* 2013;91(3):1419-27. 10.2527/jas.2012-5670.
- Duarte MS, Paulino PV, Das AK, Wei S, Serao NV, Fu X, *et al.* Enhancement of adipogenesis and fibrogenesis in skeletal muscle of Wagyu compared with Angus cattle. *J Anim Sci.* 2013;91(6):2938-46. 10.2527/jas.2012-5892.
- Francetic T, Li Q. Skeletal myogenesis and Myf5 activation. *Transcription.* 2011;2(3):109-14. 10.4161/trns.2.3.15829.

- Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Salvador J. Leptin-induced lipolysis opposes the tonic inhibition of endogenous adenosine in white adipocytes. *FASEB J.* 2001;15(2):333-40. 10.1096/fj.00-0249com.
- Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res.* 2005;46(7):1369-79. 10.1194/jlr.M400373-JLR200.
- Ghosh J, Murphy MO, Turner N, Khwaja N, Halka A, Kielty CM, *et al.* The role of transforming growth factor beta1 in the vascular system. *Cardiovasc Pathol.* 2005;14(1):28-36. 10.1016/j.carpath.2004.11.005.
- Giannouli CC, Kletsas D. TGF-beta regulates differentially the proliferation of fetal and adult human skin fibroblasts via the activation of PKA and the autocrine action of FGF-2. *Cell Signal.* 2006;18(9):1417-29. 10.1016/j.cellsig.2005.11.002.
- Graugnard DE, Piantoni P, Bionaz M, Berger LL, Faulkner DB and Loor JJ. Adipogenic and energy metabolism gene networks in Longissimus Lumborum during rapid post-weaning growth in Angus and Angus3Simmental cattle fed high-starch or low-starch diets. *BMC Genomics.* 2009, 10, 142.
- Gupta RK, Arany Z, Seale P, Mepani RJ, Ye L, Conroe HM, *et al.* Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature.* 2010;464(7288):619-23. 10.1038/nature08816.
- Gupta RK, Mepani RJ, Kleiner S, Lo JC, Khandekar MJ, Cohen P, *et al.* Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell Metab.* 2012;15(2):230-9. 10.1016/j.cmet.2012.01.010.
- Hausman and Poulos. Recruitment and differentiation of intramuscular preadipocytes in stromal-vascular cell cultures derived from neonatal pig semitendinosus muscles. *J. Anim. Sci.* 2004. 82:429–43
- Hausman GJ, Dodson MV, Ajuwon K, Azain M, Barnes KM, Guan LL, *et al.* Board-invited review: the biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. *J Anim Sci.* 2009;87(4):1218-46. 10.2527/jas.2008-1427.
- Hennebry A, Berry C, Siriatt V, O'Callaghan P, Chau L, Watson T, *et al.* Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;296(3):C525-34. 10.1152/ajpcell.00259.2007.
- Hirai S, Matsumoto H, Hino N, Kawachi H, Matsui T, Yano H. Myostatin inhibits differentiation of bovine preadipocyte. *Domest Anim Endocrinol.* 2007;32(1):1-14.
- Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(20):11073-8.

- Huang Y, Das AK, Yang QY, Zhu MJ, Du M. Zfp423 promotes adipogenic differentiation of bovine stromal vascular cells. *PLoS One*. 2012;7(10):e47496. 10.1371/journal.pone.0047496.
- Hwang CS, Loftus TM, Mandrup S, Lane MD. Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997;13:231-59. 10.1146/annurev.cellbio.13.1.231.
- Joe AW, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J, *et al*. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol*. 2010;12(2):153-63. 10.1038/ncb2015.
- Johnston, D. J., A. Reverter, D. M. Ferguson, J. M. Thompson, and H. M. Burrow. 2003. Genetic and phenotypic characterisation of animal, carcass, and meat quality traits from temperate and tropically adapted beef breeds. 3. Meat quality traits. *Aust. J. Agric. Res.* 54:135-147. doi:10.1071/AR02087.
- Kennedy L, Shi-Wen X, Carter DE, Abraham DJ, Leask A. Fibroblast adhesion results in the induction of a matrix remodeling gene expression program. *Matrix Biol*. 2008;27(4):274-81. 10.1016/j.matbio.2008.01.004.
- Kim HS, Liang L, Dean RG, Hausman DB, Hartzell DL, Baile CA. Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281(4):902-6. 10.1006/bbrc.2001.4435.
- Martins TS, Sanglard LM, Silva W, Chizzotti ML, Renno LN, Seroo NV, *et al*. Molecular Factors Underlying the Deposition of Intramuscular Fat and Collagen in Skeletal Muscle of Nellore and Angus Cattle. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139943. 10.1371/journal.pone.0139943.
- McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(23):12457-61.
- Nakamura MT, Yudell BE, Looor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res*. 2014;53:124-44. 10.1016/j.plipres.2013.12.001.
- Pantoja C, Huff JT, Yamamoto KR. Glucocorticoid signaling defines a novel commitment state during adipogenesis in vitro. *Mol Biol Cell*. 2008;19(10):4032-41. 10.1091/mbc.E08-04-0420.
- Rawls A, Morris JH, Rudnicki M, Braun T, Arnold HH, Klein WH, *et al*. Myogenin's functions do not overlap with those of MyoD or Myf-5 during mouse embryogenesis. *Dev Biol*. 1995;172(1):37-50. 10.1006/dbio.1995.0004.
- Reverter, A., D. J. Johnston, D. Perry, M. E. Goddard, and H. M. Burrow. 2003. Genetic and phenotypic characterisation of animal, carcass, and meat quality traits from temperate and tropically adapted beef breeds. 2. Abattoir carcass traits. *Aust. J. Agric. Res.* 54:119-134. doi:10.1071/AR02088.
- Rios R, Carneiro I, Arce VM, Devesa J. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2002;282(5):C993-C9.



- Roberts SL, Lancaster PA, DeSilva U, Horn GW, Krehbiel CR. Coordinated gene expression between skeletal muscle and intramuscular adipose tissue in growing beef cattle. *J Anim Sci.* 2015;93(9):4302-11. 10.2527/jas.2015-8886.
- Rodgers BD, Garikipati DK. Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review. *Endocr Rev.* 2008;29(5):513-34. 10.1210/er.2008-0003.
- Roth JF, Shikama N, Henzen C, Desbaillets I, Lutz W, Marino S, *et al.* Differential role of p300 and CBP acetyltransferase during myogenesis: p300 acts upstream of MyoD and Myf5. *EMBO J.* 2003;22(19):5186-96. 10.1093/emboj/cdg473.
- Salvadori C, Peters IR, Day MJ, Engvall E, Shelton GD. Muscle regeneration, inflammation, and connective tissue expansion in canine inflammatory myopathy. *Muscle Nerve.* 2005;31(2):192-8. 10.1002/mus.20252.
- Savell JW, Cross HR. The Role of Fat in the Palatability of Beef, Pork, and Lamb. In: Council NR, Agriculture B, Products CTOINAA, editors. *Designing Foods: Animal Product Options in the Marketplace*: National Academies Press; 1988.
- Singh K, Dilworth FJ. Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors. *FEBS J.* 2013;280(17):3991-4003. 10.1111/febs.12188.
- Soret B, Mendizabal JA, Arana A, Alfonso L. Expression of genes involved in adipogenesis and lipid metabolism in subcutaneous adipose tissue and longissimus muscle in low-marbled Pirenaica beef cattle. *Animal.* 2016;10(12):2018-26. 10.1017/S175173111600118X.
- Tajbakhsh S, Buckingham M. The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Curr Top Dev Biol.* 2000;48:225-68.
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR- Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods.* 2010;50(4):S1-5. 10.1016/j.ymeth.2010.01.005.
- Tichopad A, Kitchen R, Riedmaier I, Becker C, Stahlberg A, Kubista M. Design and optimization of reverse-transcription quantitative PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(10):1816-23. 10.1373/clinchem.2009.126201.
- Tong J, Zhu MJ, Underwood KR, Hess BW, Ford SP, Du M. AMP-activated protein kinase and adipogenesis in sheep fetal skeletal muscle and 3T3-L1 cells. *J Anim Sci.* 2008;86(6):1296-305. 10.2527/jas.2007-0794.
- Trayhurn P, Drevon CA, Eckel J. Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Arch Physiol Biochem.* 2011;117(2):47-56. 10.3109/13813455.2010.535835.
- Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol.* 2010;12(2):143-52. 10.1038/ncb2014.



- Uezumi A, Ito T, Morikawa D, Shimizu N, Yoneda T, Segawa M, *et al.* Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 21):3654-64. 10.1242/jcs.086629.
- Wang, Y.H, Bower N.I, Reverter A, Tan S.H, De Jager N. Wang R. *et al.* Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. *J. Anim. Sci.* 2009; 87:119-130. doi:10.2527/jas.2008-1082.
- Wertz A, Berger L, Walker P, Faulkner D, McKeith F, Rodriguez-Zas S. Early-weaning and postweaning nutritional management affect feedlot performance, carcass merit, and the relationship of 12th-rib fat, marbling score, and feed efficiency among Angus and Wagyu heifers. *J Anim Sci.* 2002;80(1):28-37.
- Wertz E, Berge L, Walker P, Faulkner D, McKeith F, Rodriguez-Zas S. Early weaning and postweaning nutritional management affect feedlot performance of Angus x Simmental heifers and the relationship of 12th rib fat and marbling score to feed efficiency. *J Anim Sci.* 2001;79(7):1660-9.



## CHAPTER 8

## DISCUSIÓN GENERAL



En la presente tesis doctoral se ha analizado el desarrollo de la grasa intramuscular (GIM) en distintos músculos de animales de dos razas de vacuno con diferente precocidad en su acumulación y la expresión de factores involucrados en la formación de adipocitos (adipogénesis), de células musculares (miogénesis) y del tejido conectivo (fibrogénesis).

La GIM se diferencia de los otros tejidos adiposos, como el subcutáneo (SC) o el visceral, tanto en el potencial proliferativo presentado por los preadipocitos y la respuesta a factores adipogénicos como en su metabolismo (Gardan *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Hausman *et al.*, 2008; Rajesh *et al.*, 2010). Esto es debido, al menos en parte, a su localización, ya que se encuentra embebida entre los tejidos muscular y conectivo.

Los adipocitos, las células musculares (miocitos) y las células del tejido conectivo (fibroblastos) proceden de células precursoras pluripotentes comunes (Tang y Lane, 2012). Esto puede llevar a pensar que el desarrollo de la GIM estaría ligado al de las fibras musculares y el tejido conectivo que le rodea y a que, por lo tanto, en su regulación puedan intervenir, además de la adipogénesis, otros procesos como la fibrogénesis y la miogénesis (Bonnet *et al.*, 2010).

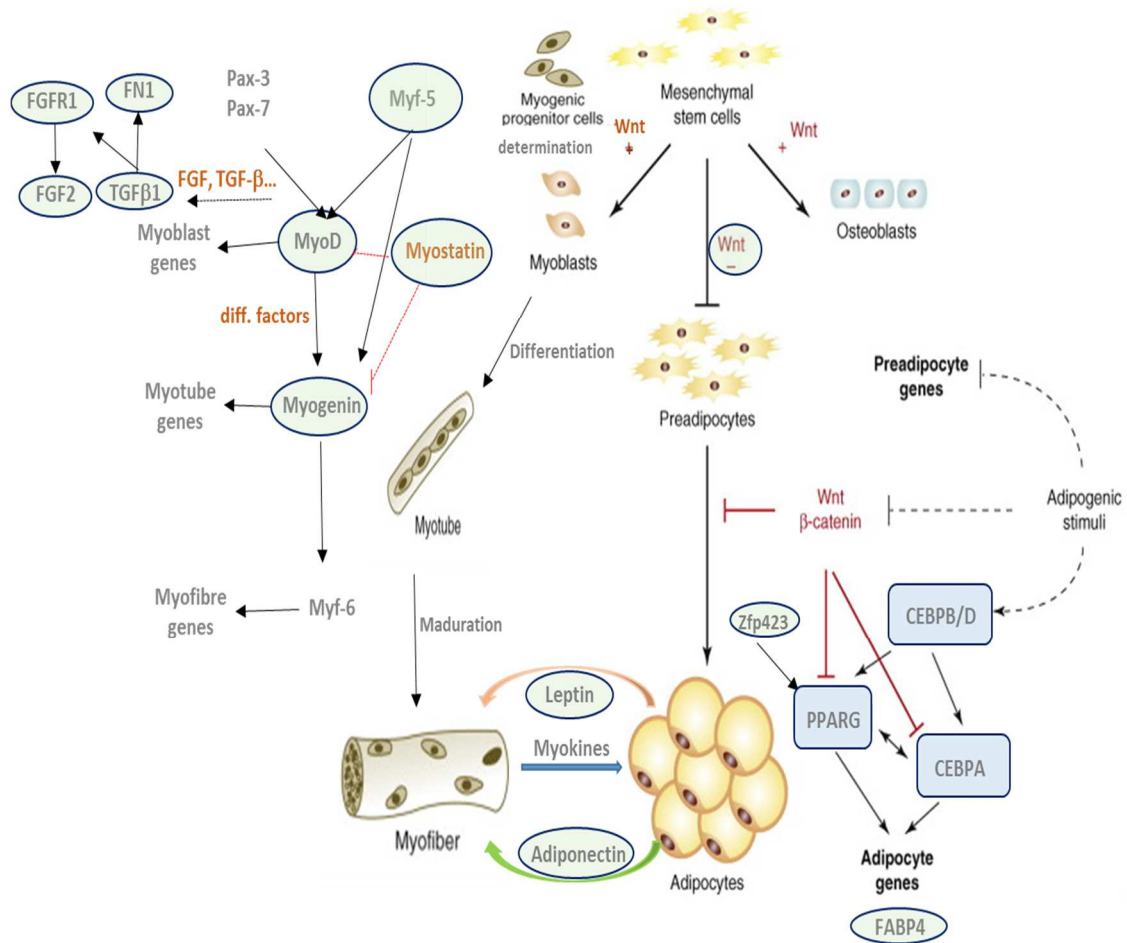
En cuanto a los adipocitos, el proceso de diferenciación es iniciado por un grupo de factores y citoquinas, no totalmente definidos, mediante el cual estas células progenitoras son determinadas hacia el linaje celular de los adipocitos, pasando por una etapa previa denominada “preadipocito”. La determinación celular progresa hacia la diferenciación inducida por la acción de otras señales que promueven la acumulación de lípidos en las células, produciendo adipocitos completamente diferenciados (Yu *et al.*, 1997; MacDougald *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2004) (Figura 8.1).

Los mecanismos implicados en la etapa de determinación de los preadipocitos son menos conocidos que los de diferenciación. Aún así, se ha identificado que la expresión del factor de transcripción denominado *zinc-finger protein (Zfp) 423* induce a las células progenitoras a ser preadipocitos (en células NIH 3T3 y de grasa subcutánea), lo que implica la posterior expresión del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPARG) y la diferenciación terminal de las células (Gupta *et al.*, 2010, 2012).

La diferenciación de los preadipocitos se ha estudiado ampliamente y se ha llegado a un modelo paradigmático que muestra este proceso como una cascada de activación transcripcional en la que inicialmente, y bajo el efecto de determinados estímulos, se expresan los factores de transcripción proteína de unión a la secuencia CCAAT beta y delta (*CEBPB* y *CEBPD*). Estos factores actúan a la vez como reguladores tempranos de la diferenciación y activadores de los factores de transcripción “clave” en este proceso: *CEBPA* y *PPARG*, que regulan la adipogénesis y activan, de forma coordinada, la expresión de los genes que mantienen el fenotipo característico del adipocito (entre otros, la proteína de unión a ácidos grasos (*FABP4*) y la leptina (*LEP*)).

Por otro lado, el factor *wingless-Int 10B* (*WNT10B*) se ha identificado como inhibidor de la adipogénesis ya que se ha demostrado que cuando este factor se expresa en las células, los preadipocitos se mantienen en un estado no diferenciado. Este efecto parece estar mediado por la inhibición de los factores de transcripción *CEBPA* y *PPARG*, mientras que, por el contrario, la inhibición de *WNT10B* endógeno estimula la adipogénesis de preadipocitos en cultivo (Ross *et al.*, 2000; Bennet *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2002; Bennet *et al.*, 2003; Longo *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2005).

En cuanto al mecanismo de acción de la vía de señalización *Wnt*, cuando el sistema es inhibido, la *B-catenina* citoplasmática es fosforilada por acción de la enzima glicógeno sintasa kinasa 3 (*GSK3*) y se degrada en el citoplasma, promoviéndose entonces la adipogénesis. Cuando por el contrario se activa el sistema de señalización *Wnt*, la *B-catenina* del citoplasma se estabiliza y se transloca al núcleo, donde actúa regulando la transcripción de genes que promueven la miogénesis e inhiben la adipogénesis.



**Figura 8.1.** Adipogénesis, fibrogénesis y miogénesis y posible relación de algunos factores implicados en estos procesos. Adaptado de varios autores (Christodoulides *et al.*, 2008; Romacho *et al.*, 2014)

Las células mesenquimáticas pluripotentes también son el origen de las células musculares, que pueden ser determinadas hacia el linaje miogénico como resultado de la exposición a factores que se producen en los tejidos adyacentes (Kollias y McDermott, 2008). En estas células se inicia la expresión de los principales factores reguladores de la miogénesis (factor miogénico 5 o *Myf5*, diferenciador miogénico D1 o *MyoD*, miogenina o *MyoG* y factor de regulación miogénica 4 o *MRF4*) de forma coordinada y jerárquica, conduciendo esto a la diferenciación celular (Buckingham, 2001; Petropoulos y Skerjnan, 2002; Kollias y MacDermott, 2008). *Myf5* es necesario para la determinación de las células progenitoras de los miotomos, siendo redundante con *MRF4* en este contexto. *MyoD* promueve la proliferación de las células determinadas al linaje

miogénico e inicia la diferenciación por inducción de la expresión de la miogenina, que activa genes implicados en la diferenciación terminal. Tras una expresión transiente temprana, *MRF4* se vuelve a expresar en las fibras diferenciadas donde controla los genes específicos de las miofibras (Makarenkova y Meech, 2012).

Por otro lado, el proceso de fibrogénesis conduce a la síntesis y unión de colágeno (relacionado con la terneza de la carne) y está mediado por la vía de señalización del factor de crecimiento transformante (*TGFB*) (Chen *et al.*, 2005), que promueve la fibrosis por medio de la inducción de genes como el de la fibronectina (*FN1*) (Kennedy *et al.*, 2008). De entre los distintos factores implicados en la regulación de la fibrogénesis, *TGFB* es la citoquina profibrogénica más importante (Liu y Pravia, 2010). La isoforma *TGFB1* se expresa principalmente en células endoteliales, fibroblastos, células hematopoyéticas y células del músculo liso (Ghosh *et al.*, 2005) y está implicada en la activación de la expresión de genes fibrogénicos que incluyen el procolágeno y las enzimas que catalizan la unión de las moléculas de colágeno (Massague y Chen, 2000). Los factores Receptor del factor de crecimiento 1 (*FGFR1*) y Factor de crecimiento 2 (*FGF2*) juegan un papel clave en los procesos de proliferación y diferenciación de una amplia variedad de células y tejidos. Es conocido que los componentes de la superfamilia *TGF* regulan distintos aspectos del desarrollo, incluyendo la adipogénesis y diferentes estudios en modelos celulares y animales han caracterizado sus efectos en el desarrollo de los adipocitos, la adiposidad y el consumo energético (Zamani y Brown, 2011). Así, mientras algunos de estos factores, como la proteína morfogénica ósea 4 (*BMP4*), promueven la diferenciación de los adipocitos del tejido adiposo blanco, otros como *TGFB* inhiben el desarrollo de estas células. También se ha observado que otros miembros de esta superfamilia de factores presentan efectos tanto activadores como inhibidores sobre la adipogénesis, siendo mediados estos efectos fundamentalmente por medio de la alteración de la expresión o la actividad de proteínas que controlan la cascada transcripcional, como *PPARG* y *CEBPA* (Zamani y Brown, 2011).

La posible regulación recíproca y comunicación entre estos tipos celulares parece estar mediada por citoquinas como ya se ha indicado. La miostatina (*Mstn*), o factor de crecimiento y diferenciación 8, se ha estudiado ampliamente en músculo, donde ejerce una función de regulación negativa del crecimiento del tejido muscular (McPherron y



Lee, 1997). También se ha podido detectar en tejido adiposo, aunque su función en ese tejido no está todavía bien comprendida (Feldman *et al.*, 2006). Esto es debido a que puede presentar efectos tanto positivos como negativos sobre la adipogénesis: en los preadipocitos, la miostatina inhibe la adipogénesis (Hirai *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2015) mientras que la promueve en las células mesenquimáticas pluripotentes (Kim *et al.*, 2001; Hiari *et al.*, 2006; Pantoja *et al.*, 2008), por lo que parece tener un papel en la determinación de los distintos linajes celulares. Por otro lado, la *LEP* es secretada por los adipocitos y regula la ingesta de alimento y el gasto energético; además promueve la sensibilidad a la insulina, incrementando la oxidación de los ácidos grasos y disminuyendo el almacenamiento de triacilglicerol en el músculo (Aima y Flier, 2006). La adiponectina (*ADIPOQ*) es otra adipoquina que interviene en la sensibilidad a la insulina, reduce la producción de glucosa en el hígado e incrementa la oxidación de los ácidos grasos en el músculo esquelético (Wang *et al.*, 2008; Dadson *et al.*, 2011).

Por otro lado, adipogénesis, miogénesis y fibrogénesis también comparten algunas vías moleculares; por ejemplo, la señalización por medio de la vía de señalización *Wnt* forma parte de los procesos miogénicos y adipogénicos que tienen lugar en el músculo esquelético durante el desarrollo fetal (Du *et al.*, 2011).

Así, comprender mejor el funcionamiento del proceso de adipogénesis y de los factores que lo regulan así como la implicación de las distintas vías de señalización y la comunicación entre los diferentes tejidos implicados, es un área de gran interés tanto en el ámbito de la salud humana como en el caso de los animales con fines zootécnicos, especialmente en el caso de los animales producidos para la obtención de carne y en particular, en el caso del tejido adiposo intramuscular.

En este trabajo se ha observado que los cuatro músculos estudiados, en terneros de raza Pirenaica, presentaban diferencias en la cantidad de GIM y que, a nivel celular, el tipo de distribución de los adipocitos también variaba correspondientemente. Así, los músculos *longissimus thoracis* (*LT*) y *semitendinosus* (*ST*) mostraron menor porcentaje de GIM y la distribución de las células adiposas en ellos fue unimodal mientras que los músculos *masseter* (*MS*) y *sternomandibularis* (*SM*) tenían mayor porcentaje de GIM y la distribución de la población de adipocitos fue bimodal. Otros autores habían constatado

que el tipo de metabolismo en los músculos *LT* y *ST* es predominantemente glicolítico (Robelin *et al.*, 1993; Hwang *et al.*, 2010; Lustrat *et al.*, 2016), mientras que en los músculos *MS* y *SM* el metabolismo es de tipo oxidativo (Devine *et al.*, 1984; Totland *et al.*, 1991; Picard *et al.*, 1996). Por lo tanto, parece haber una concordancia entre un metabolismo más oxidativo y una mayor cantidad de grasa acumulada y también entre ésta y el tipo de distribución del tamaño de las células adiposas. A nivel molecular sin embargo, en la expresión de los genes *PPARG*, *CEBPA* y *WNT10B* no se observaron diferencias entre los cuatro músculos analizados, aunque *FABP4* mostró mayor expresión en el músculo *LT* que en los músculos *MS* ( $P < 0,05$ ) y *SM* ( $P < 0,001$ ).

La familia proteica de las FABPs, conocidas como chaperonas lipídicas intracelulares, regulan el tráfico lipídico y sus respuestas en las células (Furuhashi y Hotamisligil, 2008). Las diferentes isoformas de esta familia se expresan en tejidos implicados en el metabolismo lipídico activo y, en general, la cantidad de FABP en las células es proporcional al metabolismo de ácidos grasos (Veerkamp y Van Moerkerk, 1993). La expresión de *FABP4* se induce de forma elevada durante la diferenciación de los adipocitos y está controlada transcripcionalmente por *PPARG* y sus agonistas, ácidos grasos, insulina y dexametasona (Amri *et al.*, 1991). Se ha propuesto que su función es facilitar el transporte de los ácidos grasos hasta los orgánulos celulares específicos para la oxidación de los lípidos en las mitocondrias o los peroxisomas (Furuhashi y Hotamisligil, 2008). Además, se ha postulado que *FABP4* activa la hormona sensible a lipasas (*hormone-sensitive lipase* o *HSL*), regulando la lipólisis (Shen *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2008) y que *FABP4* puede actuar también como proteína transportadora de los ácidos grasos generados por la lipólisis desde las gotas lipídicas para su utilización extra o intracelular (Furuhashi *et al.*, 2014). De forma que, como la lipólisis está mediada en parte por medio de la interacción de *FABP4* con *HSL* en los adipocitos (Coe *et al.*, 1999; Scheja *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2008), hay un doble mecanismo que regula la secreción de *FABP4* por parte de los mismos.

Teniendo en cuenta lo anterior, y si bien la expresión del gen *FABP4* se ha relacionado previamente con un aumento de la GIM (Thaller *et al.*, 2003; Michal *et al.*, 2006; Barendse *et al.*, 2009) y con la hipertrofia de los adipocitos (Pickworth *et al.*, 2011), la

mayor expresión de este gen en un músculo que presentaba menor cantidad de grasa, podría estar relacionada con una mayor actividad lipolítica en el mismo, de forma que la tasa de renovación (o “*turnover*”) de los ácidos grasos sería más elevada, aunque no el balance total en cuanto a la cantidad de triacilglicéridos almacenados. Alternativamente, podría estar relacionado con la participación de *FABP4* en la incorporación de ácidos grasos de cadena larga, y el diferente reparto de nutrientes entre tejidos que puede ocurrir a lo largo de los diferentes momentos de desarrollo de los animales, de forma que en el músculo *LT* este proceso específico pueda estar favorecido.

Por otro lado, y en orden comparar los resultados de un depósito adiposo con alta capacidad para el almacenamiento de grasa y sobre el que se dispone mayor información, se analizó el depósito *SC*. Se comprobó que, al igual que en los músculos *MS* y *ST*, los adipocitos en este depósito seguían una distribución bimodal, que es característica de las células de los tejidos grasos. Además, los genes implicados en la adipogénesis y lipogénesis relacionados positivamente con la deposición de grasa, como el *PPARG*, el *CEBPA* y el *FABP4*, mostraron una expresión mayor en el depósito *SC* que en los músculos estudiados, lo que concuerda con la presencia de adipocitos de mayor tamaño y la mayor capacidad de almacenamiento de grasa de este depósito, aunque la expresión de *WNT10B* fue similar en el depósito *SC* y en los músculos analizados.

Los mecanismos por los que el sistema de señalización *Wnt/B-catenina* inhiben la adipogénesis se han estudiado ampliamente y se acepta que este efecto tiene lugar por medio de la inhibición de los factores de transcripción adipogénicos *PPARG* y *CEBPA*. Por otro lado, también se ha postulado que, en situaciones en las que hay una mayor predisposición a acumular grasa, la activación de *PPARG* y *CEBPA* puede reprimir la expresión de *WNT10B*, permitiendo así que ocurra la adipogénesis, lo que se ha observado por ejemplo en el tejido muscular humano durante el envejecimiento (Taylor-Jones *et al.*, 2002). Esta hipótesis se ve reforzada por la observación de que el tratamiento de mioblastos con sustancias como las tiazolidinidonas, que son potentes activadores de la transcripción de los *PPARG*, conduce a que éstos adquieran el fenotipo de adipocitos (Teboul *et al.*, 1995). Podría por lo tanto existir una relación recíproca entre la actividad de *PPARG* y la expresión del sistema *Wnt/B-catenina* (Moldes *et al.*, 2003).

Existen además evidencias de que las modificaciones post-transcripcionales de la familia *Wnts* estarían relacionadas con la disponibilidad de ácidos grasos no esterificados (NEFA). Por ello, junto con otras observaciones, se ha propuesto que una baja disponibilidad de NEFA puede conducir a una reducida producción de los ligandos de *Wnt*. Por el contrario, bajo situaciones en las que hay una excesiva disponibilidad de lípidos, este incremento lipídico pueden conducir a una activación inapropiada de los ligandos de *Wnt* (Sethi y Vidal-Puig, 2010). Así, el sistema de señalización *Wnt/B-catenina*, además de estar implicado en la determinación de los preadipocitos, también está implicado en la diferenciación y la regulación fisiológica de la plasticidad del tejido adiposo (Sethi y Vidal-Puig, 2010).

Por tanto, es posible que la similar expresión de este factor en los depósitos adiposos estudiados se deba a una distinta participación en los procesos celulares y metabólicos en los que *WNT10B* está implicado, respondiendo a la necesidad de una mayor capacidad de almacenamiento de triglicéridos en el caso del depósito SC.

La mayoría de los estudios de expresión génica en vacuno se realizan empleando el músculo *longissimus* (Moisá *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2015; Soret *et al.*, 2016). Debido a que la localización anatómica y las distintas funciones que presentan los músculos pueden estar relacionadas con diferencias en la acumulación de grasa y en el tipo de metabolismo predominante (Costa *et al.*, 2007; Hocquette *et al.*, 2010), parece claro que no es adecuado extrapolar al conjunto de músculos los resultados obtenidos analizando únicamente uno de ellos. Por ello, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos al comparar los cuatro músculos en cuanto a cantidad GIM, distribución del tamaño de los adipocitos y, en menor medida pero también de forma importante los relativos a la expresión génica, se consideró apropiado seleccionar como representativos los músculos *LT* y *MS*.

Así, y en orden a estudiar también el efecto de la raza, se analizó la expresión de los genes adipogénicos, miogénicos y fibrogénicos y de las citoquinas seleccionados, en estos dos músculos en terneros de las razas Pirenaica y Frisona (Figuras 8.2 y 8.3).

Al analizar la expresión de los genes se observa que en ambas razas los marcadores estudiados presentan, en general, diferencias en expresión similares entre los dos

músculos (Figura 8.2). Así, al igual que lo observado en el caso de los terneros Pirenaicos, en los Frisones la expresión de *PPARG* y *CEBPA*, genes reguladores centrales en la activación de la adipogénesis (MacDougald *et al.*, 1995; Schwarz *et al.*, 1997; Rosen *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2012), y del gen *WNT10B*, que produce un efecto contrario (Ross *et al.*, 2000; Bennett *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2012) no mostró diferencias entre los distintos músculos estudiados. En este caso además, el gen *FABP4* no se expresó significativamente más en el músculo *LT* en comparación con el *MS*. Igualmente, en los músculos *LT* y *MS* de los terneros Frisones no hubo diferencias en la *GIM*, a diferencia de lo observado en los Pirenaicos, en los que el músculo *MS* presentó mayor acumulación de grasa intramuscular. Además, en ambas razas, la distribución de los adipocitos en el músculo *LT* fue unimodal mientras que en el caso del músculo *MS* fue bimodal, indicando una mayor participación del proceso de hipertrofia en su desarrollo.

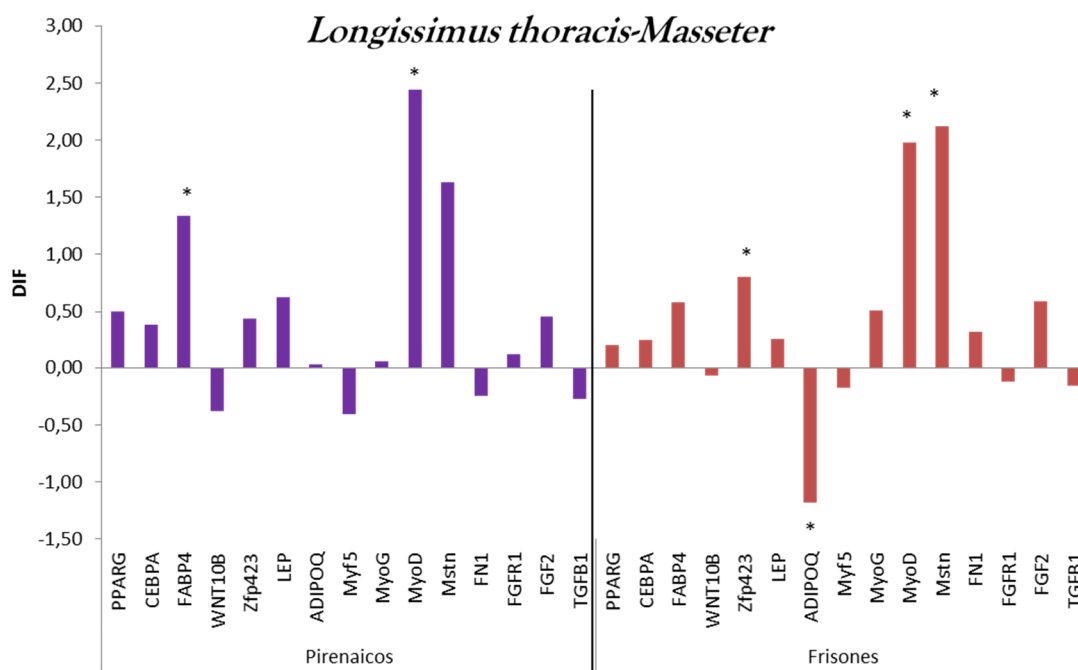
En cuanto al gen *Zfp423*, implicado en la determinación temprana de los preadipocitos y la posterior activación de *PPARG*, se expresó más en el músculo *LT* que en el *MS* en el caso de los terneros Frisones, pero no mostró diferencias entre músculos en el caso de los Pirenaicos. La expresión de *Zfp423* induce a las células progenitoras a diferenciarse en preadipocitos, lo que podría llevar a pensar que este proceso era más intenso en el músculo *LT* de los terneros Frisones en el momento del desarrollo en el que se tomaron las muestras.

En cuanto a las adipoquinas analizadas, *ADIPOQ*, implicada como ya se ha mencionado en la oxidación de los ácidos grasos en el músculo esquelético (Wang *et al.*, 2008; Dadson *et al.*, 2011), se expresó más en el *MS* de los terneros Frisones pero no mostró diferencias entre músculos en los Pirenaicos, mientras que *LEP* se expresó al mismo nivel en los dos músculos y en las dos razas. Igualmente, los genes relacionados con la fibrogénesis no mostraron diferencias entre músculos, ocurriendo lo mismo en ambas razas, lo que concordaría con el similar porcentaje de colágeno total y soluble medido.

Del mismo modo, los genes miogénicos *Myf5* y *MyoG* se expresaron al mismo nivel en los dos músculos en las dos razas, pero el gen *MyoD* se expresó más abundantemente en el músculo *LT* que en el *MS*, ocurriendo lo mismo tanto en los terneros Pirenaicos como en los Frisones. *Myf5* y *MyoD* se expresan en mioblastos en proliferación y son necesarios

para la determinación miogénica, aunque están sujetos a diferente regulación del ciclo celular. Por su parte, *MyoD* se sobreexpresa de forma temprana tras la inducción de la diferenciación y se relaciona con la expresión de genes relacionados con los mioblastos. Los niveles de ambos factores disminuyen progresivamente tras este proceso, mientras que el nivel de *MyoG*, relacionada con los genes de los miotubos, aumenta a lo largo de la diferenciación, es decir, hay una jerarquización coordinada en la expresión de estos factores de transcripción. Por ello, los resultados obtenidos pueden estar indicando que en el músculo *LT* se está produciendo la proliferación temprana de los mioblastos, acorde con un mayor desarrollo de fibras musculares en este músculo.

Por otro lado, la *Mstn* no mostró diferente nivel de expresión entre los dos músculos en los terneros Pirenaicos pero fue más elevada en el músculo *LT* de los terneros Frisones, resultado que parece que no concorda con una expresión más elevada de *MyoD*. Por otro lado, y como se ha mencionado anteriormente, se ha observado que la *Mstn* promueve la adipogénesis en las células mesenquimáticas pluripotentes (Kim *et al.*, 2001; Hiari *et al.*, 2006; Pantoja *et al.*, 2008), por lo que podría haber una relación entre la mayor expresión de esta mioquina y la del factor *Zfp423*, implicado en el inicio de la diferenciación de las células progenitoras en preadipocitos, que también era más elevada en este músculo en los terneros Frisones.



**Figura 8.2.** Diferencias en los valores de expresión normalizados entre los músculos *longissimus thoracis* y *masseter* para terneros de raza Pirenaica y Frisona.

Al comparar las dos razas estudiadas se observó que en el músculo *LT* de los terneros Frisones había un mayor porcentaje de GIM que en los terneros Pirenaicos, lo que ya había sido observado previamente por otros autores (Lizaso *et al.*, 2011) y parece estar de acuerdo con el hecho de que la raza Frisona, al ser más precoz, experimenta un desarrollo más temprano de la GIM (Eguinoa *et al.*, 2003). En ambas razas, los adipocitos del músculo *LT* mostraron una distribución de la población de tipo unimodal mientras que el valor medio del diámetro de los adipocitos fue mayor en los terneros Frisones que en los Pirenaicos, acorde a la mayor cantidad de grasa. En cuanto a la expresión de los marcadores analizados (Figura 8.3), los terneros Frisones expresaron el gen *FABP4* a mayor nivel que los Pirenaicos mientras que la expresión de los genes *PPARG* y *Mstn* fue mayor en estos últimos. Por otro lado, el resto de marcadores analizados, en ambas razas, se expresaron a niveles similares en los dos músculos.

En el músculo *MS*, no hubo diferencias en el porcentaje de GIM entre ambas razas y la distribución de los adipocitos fue bimodal, no observándose diferencias significativas entre los parámetros descriptivos que caracterizan la distribución. Se observó además

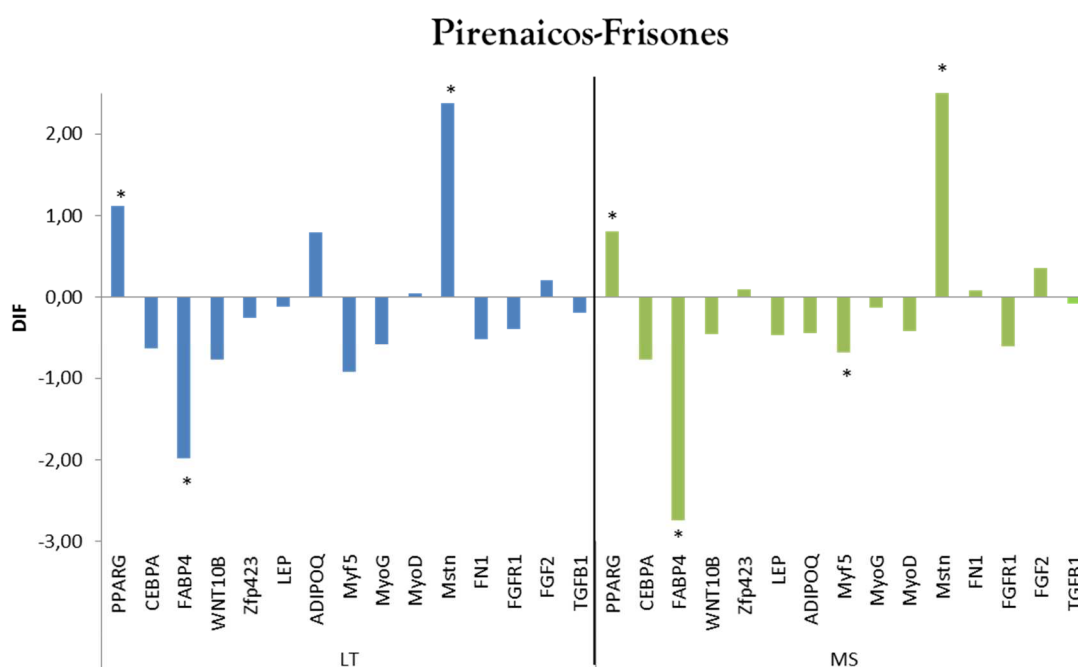
que, de igual forma que en el músculo *LT*, los terneros Frisones expresaron el gen *FABP4* a mayor nivel mientras que los Pirenaicos expresaron más los genes *PPARG* y *Mstn*. En este músculo además, se observó una menor expresión de *Myf5* en los Frisones que en los Pirenaicos. Como en el caso del *LT*, en el *MS* el resto de marcadores analizados en los terneros de ambas razas no mostraron diferencias en su nivel de expresión (Figura 8.3). Por lo tanto, en ambos músculos se observó mayor expresión de los genes *PPARG* y *Mstn* en los terneros Pirenaicos y mayor expresión del gen *FABP4* en los terneros Frisones.

Como se ha mencionado previamente, la *Mstn* se expresa de forma abundante en músculo esquelético, donde ejerce una función de regulador negativo del crecimiento muscular (McPherron *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2009), pero también puede influir sobre el desarrollo de otros tejidos como el adiposo (Zheng *et al.*, 2011). Este factor puede ejercer un papel tanto positivo como negativo sobre el tejido adiposo ya que puede actuar inhibiendo la adipogénesis de los preadipocitos (Hirai *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2015), mientras que la promueve en las células mesenquimáticas pluripotentes (Hirai *et al.*, 2007; Pantoja *et al.*, 2008). Así, se ha sugerido que la *Mstn* puede estimular la acumulación de grasa (McPherron y Lee, 2002), probablemente por medio de modificaciones en los factores de transcripción adipogénicos, incluyendo *PPARG* (Lin *et al.*, 2002).

En el caso de la comparación entre los dos músculos estudiados, se observó una mayor expresión de *Mstn* en el músculo *LT* en los terneros Frisones así como la del factor *Zfp423*, mientras que al comparar las razas, también ocurre una mayor expresión de esta mioquina y otro factor implicado en la adipogénesis, *PPARG* en este caso. Por lo tanto, los resultados en conjunto podrían apuntar a una la activación de las células precursoras de los adipocitos relacionada con una mayor expresión de *Mstn*. Por otro lado, la *Mstn* podría estar ejerciendo también efectos sobre las células precursoras del linaje de los miocitos, por lo que la menor expresión de esta mioquina en los Frisones estaría de acuerdo con una mayor expresión del factor *Myf5*, considerado uno de los factores iniciales en el proceso de miogénesis, necesario para la determinación de las células precursoras y la diferenciación de los mioblastos.



En general, la cantidad de FABP en las células es proporcional al metabolismo de ácidos grasos (Veerkamp y Van Moerkerk, 1993) y la expresión de este gen se ha relacionado con la hipertrofia de los adipocitos (Pickworth *et al.*, 2011). Estas proteínas están implicadas en el transporte intracelular de los ácidos grasos de cadena larga interviniendo en su incorporación de estas moléculas a las células, uniéndose a ellos y transportándolos al interior de las células. En este sentido, los animales de raza Frisona, debido a su selección para la producción de leche, podrían presentar una mayor expresión de este gen, facilitando así la incorporación de ácidos grasos exógenos. La mayor expresión de *FABP4* en los terneros Frisones podría así estar relacionada con un mayor número de células adiposas en los músculos estudiados, que presentarían en conjunto más superficie celular, favoreciendo la presencia de mayor cantidad de proteínas *FABP4* y la hipertrofia celular, como parece indicar el mayor tamaño de los adipocitos en el músculo *LT* (Figura 6.1 y Tabla 6.3) y la tendencia a células de mayor tamaño en el *MS* (Figura 6.1 y Tabla 6.4).



**Figura 8.3.** Diferencias en los valores de expresión normalizados entre terneros de las razas Pirenaica y Frisona en los músculos *longissimus thoracis* y *masseter*.

Además del estudio de la expresión génica, otro de los objetivos de esta tesis doctoral fue el análisis de la variabilidad asociada a los experimentos de RT-qPCR (qPCR). Esta técnica se ha convertido en una de las principales herramientas para la cuantificación de la expresión génica debido a la sensibilidad y especificidad de este tipo de análisis así como a su sencillez y rapidez (Bustin, 2009). Sin embargo, la capacidad para detectar una expresión diferencial entre los genes estudiados puede estar limitada por una alta variabilidad asociada a los resultados en experimentos de qPCR. Por ello, el minimizar la variabilidad y reducir la confusión entre la variación biológica y la variación asociada al trabajo experimental, podría facilitar una detección más eficiente de cambios en la expresión génica, de menor magnitud, pero con un efecto biológico relevante, en procesos como el de la deposición de GIM.

Se debe tener en cuenta que un experimento de qPCR diseñado para detectar la existencia de diferencias en la expresión génica entre grupos de sujetos biológicos expuestos a diferentes tratamientos implica varios pasos, entre ellos, el muestreo del material biológico, la extracción del ARN, la transcripción inversa (RT) del ARN en ADNc y la amplificación de la ADNc mediante qPCR. Además de la etapa de amplificación, las etapas experimentales que le preceden pueden tener un efecto significativo en la variabilidad total (Tichopad *et al.*, 2009), por lo que no se debe caer en el error de ignorar estos pasos precedentes y su contribución al error total. Evaluar objetivamente la contribución de cada una de las etapas individuales del experimento a la variabilidad total, requiere de la utilización de un modelo que refleje la estructura aditiva de esta variabilidad.

A lo largo de los diferentes experimentos realizados, se ha visto que, independientemente del gen, músculo o raza utilizada, los factores que aportan más variabilidad son las réplicas en el muestreo y la RT. Por el contrario, el último paso del experimento, la qPCR no presentó prácticamente variabilidad. Como ya se ha comentado en los anteriores capítulos, esta conclusión también había sido alcanzada por autores como Tichopad *et al.*, (2009). Por esta razón, después del estudio de variabilidad realizado, se recomienda la utilización de replicados en los pasos de muestreo y RT.

## REFERENCES

- Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:413-37. 10.1146/annurev.physiol.62.1.413.
- Amri EZ, Bertrand B, Ailhaud G, Grimaldi P. Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression. *J Lipid Res.* 1991;32(9):1449-56.
- Barendse W, Bunch RJ, Thomas MB, Harrison BE. A splice site single nucleotide polymorphism of the fatty acid binding protein 4 gene appears to be associated with intramuscular fat deposition in longissimus muscle in Australian cattle. *Anim Genet.* 2009;40(5):770-3. 10.1111/j.1365-2052.2009.01913.x.
- Bennett CN, Hodge CL, MacDougald OA, Schwartz J. Role of Wnt10b and C/EBPalpha in spontaneous adipogenesis of 243 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;302(1):12-6.
- Bennett CN, Ross SE, Longo KA, Bajnok L, Hemati N, Johnson KW, *et al.* Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem.* 2002;277(34):30998-1004. 10.1074/jbc.M204527200.
- Bonnet M, Cassar-Malek I, Chilliard Y, Picard B. Ontogenesis of muscle and adipose tissues and their interactions in ruminants and other species. *Animal.* 2010;4(7):1093-109. 10.1017/S1751731110000601.
- Buckingham M. Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11(4):440-8.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-22. 10.1373/clinchem.2008.112797.
- Coe NR, Simpson MA, Bernlohr DA. Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res.* 1999;40(5):967-72.
- Costa P, Roseiro LC, Bessa RJ, Padilha M, Partidario A, Marques de Almeida J, *et al.* Muscle fiber and fatty acid profiles of Mertolenga-PDO meat. *Meat Sci.* 2007;78(4):502-12. 10.1016/j.meatsci.2007.07.020.
- Chen YW, Nagaraju K, Bakay M, McIntyre O, Rawat R, Shi R, *et al.* Early onset of inflammation and later involvement of TGFbeta in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2005;65(6):826-34. 10.1212/01.wnl.0000173836.09176.c4.
- Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A. Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(1):16-24. 10.1016/j.tem.2008.09.002.
- Dadson K, Liu Y, Sweeney G. Adiponectin action: a combination of endocrine and autocrine/paracrine effects. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2011;2:62. 10.3389/fendo.2011.00062.

- Devine CE, Ellery S, Averill S. Responses of different types of ox muscle to electrical stimulation. *Meat Sci.* 1984;10(1):35-51. 10.1016/0309-1740(84)90030-5.
- Du M, Zhao JX, Yan X, Huang Y, Nicodemus LV, Yue W, *et al.* Fetal muscle development, mesenchymal multipotent cell differentiation, and associated signaling pathways. *J Anim Sci.* 2011;89(2):583-90. 10.2527/jas.2010-3386.
- Eguinoa P, Brocklehurst S, Arana A, Mendizabal JA, Vernon RG, Purroy A. Lipogenic enzyme activities in different adipose depots of Pirenaican and Holstein bulls and heifers taking into account adipocyte size. *J Anim Sci.* 2003;81(2):432-40.
- Feldman BJ, Streeper RS, Farese RV, Jr., Yamamoto KR. Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(42):15675-80. 10.1073/pnas.0607501103.
- Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(6):489-503. 10.1038/nrd2589.
- Furuhashi M, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clin Med Insights Cardiol.* 2014;8(Suppl 3):23-33. 10.4137/CMC.S17067.
- Gardan D, Gondret F, Louveau I. Lipid metabolism and secretory function of porcine intramuscular adipocytes compared with subcutaneous and perirenal adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(2):E372-80. 10.1152/ajpendo.00482.2005.
- Ghosh J, Murphy MO, Turner N, Khwaja N, Halka A, Kielty CM, *et al.* The role of transforming growth factor beta1 in the vascular system. *Cardiovasc Pathol.* 2005;14(1):28-36. 10.1016/j.carpath.2004.11.005.
- Guo T, Jou W, Chanturiya T, Portas J, Gavrilova O, McPherron AC. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. *PLoS One.* 2009;4(3):e4937. 10.1371/journal.pone.0004937.
- Gupta RK, Arany Z, Seale P, Mepani RJ, Ye L, Conroe HM, *et al.* Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature.* 2010;464(7288):619-23. 10.1038/nature08816.
- Gupta RK, Mepani RJ, Kleiner S, Lo JC, Khandekar MJ, Cohen P, *et al.* Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell Metab.* 2012;15(2):230-9. 10.1016/j.cmet.2012.01.010.
- Hausman GJ, Poulos SP, Pringle TD, Azain MJ. The influence of thiazolidinediones on adipogenesis in vitro and in vivo: potential modifiers of intramuscular adipose tissue deposition in meat animals. *J Anim Sci.* 2008;86(14 Suppl):E236-43. 10.2527/jas.2007-0219.
- Hirai S, Matsumoto H, Hino N, Kawachi H, Matsui T, Yano H. Myostatin inhibits differentiation of bovine preadipocyte. *Domest Anim Endocrinol.* 2007;32(1):1-14.

- Hocquette JF, Gondret F, Baeza E, Medale F, Jurie C, Pethick DW. Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal*. 2010;4(2):303-19. 10.1017/S1751731109991091.
- Hwang YH, Kim GD, Jeong JY, Hur SJ, Joo ST. The relationship between muscle fiber characteristics and meat quality traits of highly marbled Hanwoo (Korean native cattle) steers. *Meat Sci*. 2010;86(2):456-61. 10.1016/j.meatsci.2010.05.034.
- Kang S, Bajnok L, Longo KA, Petersen RK, Hansen JB, Kristiansen K, *et al*. Effects of Wnt signaling on brown adipocyte differentiation and metabolism mediated by PGC-1 $\beta$ . *Mol Cell Biol*. 2005;25(4):1272-82.
- Kennedy L, Shi-Wen X, Carter DE, Abraham DJ, Leask A. Fibroblast adhesion results in the induction of a matrix remodeling gene expression program. *Matrix Biol*. 2008;27(4):274-81. 10.1016/j.matbio.2008.01.004.
- Kim HS, Liang L, Dean RG, Hausman DB, Hartzell DL, Baile CA. Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281(4):902-6. 10.1006/bbrc.2001.4435.
- Kollias HD, McDermott JC. Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2008;104(3):579-87. 10.1152/jappphysiol.01091.2007.
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang C-Y, Wu Z, Boss O, *et al*. Transcriptional co-activator PGC-1 $\alpha$  drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 2002;418(6899):797-801.
- Listrat A, Lebret B, Louveau I, Astruc T, Bonnet M, Lefaucheur L, *et al*. How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality. *ScientificWorldJournal*. 2016;2016:3182746. 10.1155/2016/3182746.
- Liu RM, Gaston Pravia KA. Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(1):1-15. 10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.026.
- Lizaso G, Beriain MJ, Horcada A, Chasco J, Purroy A. Effect of intended purpose (dairy/beef production) on beef quality. *Canadian Journal of Animal Science*. 2011;91(1):97-102. 10.4141/cjas10078.
- Longo KA, Wright WS, Kang S, Gerin I, Chiang S-H, Lucas PC, *et al*. Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(34):35503-9.
- MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(20):9034-7.

- MacDougald OA, Mandrup S. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(1):5-11.
- Makarenkova HP, Meech R. Chapter four - Barx Homeobox Family in Muscle Development and Regeneration. In: Kwang WJ, editor. *International Review of Cell and Molecular Biology*: Academic Press; 2012. p. 117-73.
- Martins TS, Sanglard LM, Silva W, Chizzotti ML, Renno LN, Serao NV, *et al.* Molecular Factors Underlying the Deposition of Intramuscular Fat and Collagen in Skeletal Muscle of Nellore and Angus Cattle. *PLoS One.* 2015;10(10):e0139943. 10.1371/journal.pone.0139943.
- Massagué J, Chen Y-G. Controlling TGF $\beta$  signaling. *Genes Dev.* 2000;14(6):627-44.
- McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(23):12457-61.
- McPherron AC, Lee SJ. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest.* 2002;109(5):595-601. 10.1172/JCI13562.
- Michal JJ, Zhang ZW, Gaskins CT, Jiang Z. The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. *Anim Genet.* 2006;37(4):400-2. 10.1111/j.1365-2052.2006.01464.x.
- Moisa SJ, Shike DW, Graugnard DE, Rodriguez-Zas SL, Everts RE, Lewin HA, *et al.* Bioinformatics analysis of transcriptome dynamics during growth in angus cattle longissimus muscle. *Bioinform Biol Insights.* 2013;7:253-70. 10.4137/BBI.S12328.
- Moldes M, Ying Z, Morrison RF, Silva D, Bae-Hang P, Jiajian L, *et al.* Peroxisome-proliferator-activated receptor  $\alpha$  suppresses Wnt/ $\beta$ -catenin signalling during adipogenesis. *Biochemical Journal.* 2003;376(3):607-13.
- Pantoja C, Huff JT, Yamamoto KR. Glucocorticoid signaling defines a novel commitment state during adipogenesis in vitro. *Mol Biol Cell.* 2008;19(10):4032-41. 10.1091/mbc.E08-04-0420.
- Petropoulos H, Skerjanc IS.  $\beta$ -Catenin is essential and sufficient for skeletal myogenesis in P19 cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2002;277(18):15393-9.
- Picard BH, G.; Geay, Y.; Contractile differentiation of bovine masseter muscle. *Basic. Appl. Myol.* 1996;6(5).
- Pickworth CL, Loerch SC, Velleman SG, Pate JL, Poole DH, Fluharty FL. Adipogenic differentiation state-specific gene expression as related to bovine carcass adiposity. *J Anim Sci.* 2011;89(2):355-66. 10.2527/jas.2010-3229.
- Rajesh RV, Heo GN, Park MR, Nam JS, Kim NK, Yoon D, *et al.* Proteomic analysis of bovine omental, subcutaneous and intramuscular preadipocytes during in vitro adipogenic differentiation. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 2010;5(3):234-44. 10.1016/j.cbd.2010.06.004.

- Robelin J, Picard B, Listrat A, Jurie C, Barboiron C, Pons F, *et al.* Myosin expression in semitendinosus muscle during fetal development of cattle: immunocytochemical and electrophoretic analyses. *Reprod Nutr Dev.* 1993;33(1):25-41.
- Romacho T, Elsen M, Röhrborn D, Eckel J. Adipose tissue and its role in organ crosstalk. *Acta Physiologica.* 2014;210(4):733-53.
- Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(12):885-96. 10.1038/nrm2066.
- Ross SE, Erickson RL, Gerin I, DeRose PM, Bajnok L, Longo KA, *et al.* Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor  $\beta$  in adipocyte metabolism. *Mol Cell Biol.* 2002;22(16):5989-99.
- Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, *et al.* Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science.* 2000;289(5481):950-3.
- Scheja L, Makowski L, Uysal KT, Wiesbrock SM, Shimshek DR, Meyers DS, *et al.* Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in  $\alpha P2^{-/-}$  mice. *Diabetes.* 1999;48(10):1987-94.
- Schwarz EJ, Reginato MJ, Shao D, Krakow SL, Lazar MA. Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBP $\beta$ -mediated transcription. *Mol Cell Biol.* 1997;17(3):1552-61.
- Sethi JK, Vidal-Puig A. Wnt signalling and the control of cellular metabolism. *Biochem J.* 2010;427(1):1-17. 10.1042/BJ20091866.
- Shen W-J, Sridhar K, Bernlohr DA, Kraemer FB. Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999;96(10):5528-32.
- Smith AJ, Sanders MA, Juhlmann BE, Hertzell AV, Bernlohr DA. Mapping of the hormone-sensitive lipase binding site on the adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP) identification of the charge quartet on the AFABP/ $\alpha P2$  helix-turn-helix domain. *Journal of Biological Chemistry.* 2008;283(48):33536-43.
- Soret B, Mendizabal JA, Arana A, Alfonso L. Expression of genes involved in adipogenesis and lipid metabolism in subcutaneous adipose tissue and longissimus muscle in low-marbled Pirenaica beef cattle. *Animal.* 2016;10(12):2018-26. 10.1017/S175173111600118X.
- Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:715-36. 10.1146/annurev-biochem-052110-115718.
- Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(26):9607-11. 10.1073/pnas.0403100101.
- Taylor-Jones JM, McGehee RE, Rando TA, Lecka-Czernik B, Lipschitz DA, Peterson CA. Activation of an adipogenic program in adult myoblasts with age. *Mechanisms of ageing and development.* 2002;123(6):649-61.

- Teboul L, Gaillard D, Staccini L, Inadera H, Amri E-Z, Grimaldi PA. Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(47):28183-7.
- Thaller G, Kuhn C, Winter A, Ewald G, Bellmann O, Wegner J, *et al.* DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Anim Genet*. 2003;34(5):354-7.
- Tichopad A, Kitchen R, Riedmaier I, Becker C, Stahlberg A, Kubista M. Design and optimization of reverse-transcription quantitative PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(10):1816-23. 10.1373/clinchem.2009.126201.
- Totland GK, Kryvi H. Distribution patterns of muscle fibre types in major muscles of the bull (*Bos taurus*). *Anat Embryol (Berl)*. 1991;184(5):441-50.
- Veerkamp JH, van Moerkerk HT. Fatty acid-binding protein and its relation to fatty acid oxidation. *Mol Cell Biochem*. 1993;123(1-2):101-6.
- Wang Y, Lam KS, Yau MH, Xu A. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem J*. 2008;409(3):623-33. 10.1042/BJ20071492.
- Yu ZK, Wright JT, Hausman GJ. Preadipocyte recruitment in stromal vascular cultures after depletion of committed preadipocytes by immunocytotoxicity. *Obes Res*. 1997;5(1):9-15.
- Zamani N, Brown CW. Emerging roles for the transforming growth factor- $\beta$  superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. *Endocr Rev*. 2011;32(3):387-403. 10.1210/er.2010-0018.
- Zheng Y, Lin Y, Yue Y, Xu Y, Jin S. Expression profiles of myostatin and calpastatin genes and analysis of shear force and intramuscular fat content of yak longissimus muscle. *Czech J Anim Sci*. 2011;56:544-50.
- Zhou X, Li D, Yin J, Ni J, Dong B, Zhang J, *et al.* CLA differently regulates adipogenesis in stromal vascular cells from porcine subcutaneous adipose and skeletal muscle. *J Lipid Res*. 2007;48(8):1701-9. 10.1194/jlr.M600525-JLR200.
- Zhu HJ, Pan H, Zhang XZ, Li NS, Wang LJ, Yang HB, *et al.* The effect of myostatin on proliferation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Mol Endocrinol*. 2015;54(3):217-26.



## CHAPTER 9

### CONCLUSIONS / CONCLUSIONES



## CONCLUSIONS

In view of the results obtained in this Thesis, the following conclusions can be drawn:

1. Intramuscular fat and adipocyte size distribution data showed differences in the *longissimus thoracis* and *semitendinosus* muscles of Pirenaica bulls, which presented less intramuscular fat content and a unimodal distribution, whereas *masseter* and *sternomandibularis* exhibited a higher intramuscular fat content and a bimodal adipocyte size distribution, characteristic of adipose tissues. Nevertheless, these differences were not mirrored by the adipogenic genes *PPARG*, *CEBPA* and *WNT10B*.
2. *FABP4* gene expression was higher in the *longissimus thoracis* muscle compared to *masseter* and *sternomandibularis* in Pirenaica bulls, which presented a higher intramuscular fat percentage. Due to the involvement of *FABP4* in the intracellular and/or extracellular fatty acid transport, this result may be related to a higher lipolytic activity in the *longissimus thoracis* or, since *FABP4* is also related to the incorporation of exogenous long chain fatty acids and taking into account the different nutrient partitioning that can take place over the different development phases of the animals, this process might be favored in *longissimus thoracis* muscle.
3. *PPARG*, *CEBPA* and *FABP4* genes showed a higher expression in the subcutaneous adipose tissue depot than in the *longissimus thoracis*, *semitendinosus*, *masseter* and *sternomandibularis* muscles of Pirenaica bulls, in concordance with the presence of bigger adipocytes and the higher capacity of storing fat in this depot. Nevertheless, no differences were detected in the expression of the *WNT10B* gene, which might be related as well to the higher capacity of storing fat of the subcutaneous depot, leading to *WNT10B* expressing at a level that would allow preadipocyte recruitment.

4. *Longissimus thoracis* muscle, in Pirenaica bulls presented lower percentage of intramuscular fat compared to Friesian bulls showing, in both breeds, a unimodal adipocyte size distribution. Nevertheless, in the *masseter* muscle, with a bimodal adipocyte size distribution in the breeds studied, the fat content quantified was similar.
5. The analysis of the fibrogenic genes *FN1*, *FGFR1*, *FGF2* and *TGFB1* did not show significant differences between the two breeds studied nor in the muscles *longissimus thoracis* and *masseter*. These results are in concordance with the total and soluble collagen quantification that showed no differences for these parameters.
6. *Longissimus thoracis* and *masseter* muscles showed a higher expression of *FABP4* in Friesian compared to the Pirenaica bulls which agreed with Friesian breed showing higher precocity.
7. *Mstn* and *PPARG* gene expression was higher in *masseter* and *longissimus thoracis* muscles of Pirenaica bulls compared to Friesian. On the other hand, *longissimus thoracis* muscle of Friesian bulls exhibited a higher gene expression of *Mstn* and *Zfp423*, being the latter factor involved in the differentiation of progenitor cells into preadipocytes. Taken together, those results may be related to the effects that *Mstn* has on the promotion of adipogenesis process in pluripotent mesenchymal cells, where a minor expression of the *Mstn* could allow the beginning of the adipocyte differentiation.
8. The *MyoD* myogenic gene expression was higher in *longissimus thoracis* muscle of Pirenaica and Friesian breeds compared to the *masseter* muscle which agrees with the bigger muscular development described for the *longissimus thoracis* muscle. Otherwise, the higher expression of *Myf5* in the *masseter* muscle in Friesian bulls, would suggest that the lower expression of *Mstn* in that muscle would permit a

higher expression of the *Myf5* factor resulting in the determination of the precursor cells into myocytes.

9. The analysis of the experimental variability associated with the quantification of the gene expression through the RT-qPCR technique has shown that, among the factors studied (animal, sample replicates, RT and qPCR), the sample and RT factors were the main sources of experimental variation which contribute to the final results, independently of the breed or muscle studied. In future experiments, the inclusion of sample and RT replicates would be appropriate in order to study muscle gene expression.



## CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La grasa intramuscular y la distribución del tamaño de los adipocitos han mostrado diferencias en los músculos de los terneros de raza Pirenaica de forma que *longissimus thoracis* y *semitendinosus* presentaban menor cantidad de GIM y una distribución celular de tipo unimodal mientras que los músculos *masseter* y *sternomandibularis* tuvieron mayor contenido en grasa intramuscular y una distribución de adipocitos de tipo bimodal, característica de los tejidos adiposos. Estas diferencias sin embargo no se vieron reflejadas en la expresión de los marcadores adipogénicos *PPARG*, *CEBPA* y *WNT10B*.
2. La expresión del gen *FABP4*, en los terneros Pirenaicos, fue más alta en el músculo *longissimus thoracis* en comparación con los músculos *masseter* y *sternomandibularis*, los cuales presentaban un mayor porcentaje de grasa intramuscular. Debido a la implicación de *FABP4* en el transporte de ácidos grasos intra y extracelulares, este resultado podría estar relacionado con una mayor actividad lipolítica en el *longissimus thoracis* o con la participación de *FABP4* en la incorporación de ácidos grasos de cadena larga, y con el diferente reparto de nutrientes entre tejidos que puede ocurrir a lo largo de los diferentes momentos de desarrollo de los animales, de forma que en el músculo *longissimus thoracis* este proceso específico pueda estar favorecido
3. Los genes *PPARG*, *CEBPA* y *FABP4*, tuvieron una expresión mayor en el depósito subcutáneo que en los músculos *longissimus thoracis*, *semitendinosus*, *masseter* y *sternomandibularis* de terneros Pirenaicos, lo que concuerda con la presencia de adipocitos de mayor tamaño y la mayor capacidad de almacenamiento de grasa de este depósito. Sin embargo, no hubo diferencias en el marcador *WNT10B*, lo que podría estar relacionado también con la mayor necesidad de almacenamiento de triglicéridos en el depósito subcutáneo, que

- conduciría a que este factor se esté expresando a un nivel que permita la diferenciación de nuevas células.
4. En el músculo *longissimus thoracis*, los terneros Pirenaicos presentaron un menor porcentaje de grasa intramuscular que los Frisones y en ambos casos la distribución del tamaño de los adipocitos fue unimodal. Sin embargo, en el músculo *masseter*, con una distribución del tamaño de los adipocitos bimodal, el contenido en grasa fue similar en ambas razas.
  5. El análisis de la expresión de los genes fibrogénicos *FN1*, *FGFR1*, *FGF2* y *TGFB1* no mostró diferencias significativas ni entre las dos razas estudiadas ni entre los músculos *longissimus thoracis* y *masseter*. Estos resultados se corresponden con los obtenidos en la cuantificación de colágeno total y soluble donde tampoco se detectaron diferencias.
  6. En los músculos *longissimus thoracis* y *masseter*, la expresión del gen *FABP4* fue mayor en terneros Frisones en comparación con los terneros de raza Pirenaica, lo que concuerda con la mayor precocidad de la raza Frisona.
  7. La *Mstn* se expresó a un nivel más alto más en los terneros Pirenaicos que en los Frisones en los dos músculos, en los que también hubo mayor expresión del factor *PPARG*. Por otro lado, el nivel de expresión de la *Mstn* fue más elevado en el músculo *longissimus thoracis* de los terneros Frisones, al igual que el del factor *Zfp423*, implicado éste en el inicio de la diferenciación de las células progenitoras en preadipocitos. En conjunto, estos resultados podrían estar relacionados con los efectos que la *Mstn* ejerce sobre la promoción de la adipogénesis de las células mesenquimáticas pluripotentes, de forma que una menor expresión de la misma permitiría la expresión de los genes adipogénicos y el posterior inicio de la diferenciación de los adipocitos.
  8. La expresión del gen miogénico *MyoD* fue mayor en el músculo *longissimus thoracis* de terneros de raza Pirenaica y Frisona en comparación con el músculo



*masseter*, lo que concuerda con el mayor desarrollo muscular descrito para el músculo *longissimus thoracis*. Por otro lado, la expresión más elevada del gen *Myf5* en el músculo *masseter* en los terneros Frisones, sugeriría que la menor expresión de la *Mstn* en ese músculo podría permitir una mayor expresión de dicho factor y consiguientemente la determinación de las células precursoras de miocitos.

9. El estudio de la variabilidad experimental asociada a la cuantificación de la expresión génica por medio de RT-qPCR ha mostrado que, de entre los factores estudiados, es decir animal, muestra o réplica de muestreo, RT y qPCR, el muestreo y la RT son las principales fuentes de variación experimental que contribuyen a la variabilidad del resultado final, independientemente de la raza o músculo estudiados. En futuros experimentos, a la hora de estudiar la expresión génica de un músculo, sería adecuado incluir réplicas de muestreo y de RT.