



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

Caracterización de las sirtuínas
bovinas y su expresión en hígado,
músculo y tejido adiposo

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Yumi Elena Ghinis Hozumi

Director de Tesis:

Dra. María Ofelia Mora Izaguirre

Comité Tutorial:

Dra. Anaid Antaramián Salas

Dr. Enrique Piña Garza

Cuautitlán, Izcalli

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedico esta tesis:

A mis mejores amigas Aracely, Kazuko, Miki y Maki

A mis niños Dólar, Oscar, Nureyev, Locken, Chocolate y Mora

A mis niñas Tuffy, Almendra, Luna, Bonita, Loba, Diamante, Brisa y Camila

A los becerros que dieron su vida para la realización de este trabajo

A mí, como recordatorio de que con paciencia y perseverancia todas las metas son alcanzables

Agradecimientos

A Aracely por su amistad y apoyo sin los que este proyecto de superación personal y profesional habría sido más duro de lo que fue.

A mis niños y niñas por recibirme siempre con entusiasmo y animarme después de un largo día de trabajo, por su comprensión y amor a pesar de la poca atención que les he prestado últimamente.

A mi mamá y hermanas por su apoyo y por recibirme siempre con los brazos abiertos cuando vuelvo a casa.

A mi tutora de tesis, Dra. Ofelia Mora, por creer siempre en mí, por brindarme apoyo incondicional, entera confianza, estímulo constante y la maravillosa oportunidad de trabajar con ella y de aprender tantas cosas nuevas.

Al Dr. Armando Shimada por escucharme y brindarme todo su apoyo, confianza y ayuda cuando más los necesité y por seguir haciéndolo.

A los miembros de mi Comité Tutoral, Dra. Anaid Antaramián y Dr. Enrique Piña, por los conocimientos que me transmitieron y por brindarme su apoyo.

A los miembros de mi jurado por tomarse el tiempo de revisar y analizar mi tesis para brindarme valiosas aportaciones.

A Laura por su paciencia y excelente disposición para ayudarnos a resolver dudas y traumas existenciales.

A todos los compañeros que forman el gran equipo Mora-Shimada por haber estado ahí para escucharme, animarme y apoyarme, además de haberme recibido como un miembro más.

A Leticia Jiménez Díaz, maravillosa guía, excelente amiga e incondicional confidente, muchas gracias por tu paciencia, orientación y confianza.

A todos los chavos de Ajuchitlán, sobre todo Luis, Oliva y Tatiana, por su amistad y apoyo moral.

A Adriana González Gallardo por su invaluable ayuda y disposición para resolver dudas y solucionar problemas.

A la Unidad de Proteogenómica sin cuya ayuda no habría sido posible llevar a cabo este maravilloso proyecto.

A la Dra. Alma Núñez por la orientación brindada y por su paciencia y tolerancia.

Al personal de la Secretaría Técnica de FESC y del Departamento de Posgrado por su atención y amabilidad.

Al Dr. Francesc Villarroya y todo su maravilloso equipo por recibirme y por los tips que me dieron.

A la UNAM y al CONACYT por permitirme realizar este posgrado.

Contenido

1. Resumen.....	01
2. Abstract.....	02
3. Antecedentes.....	03
4. Revisión de Literatura.....	04
4.1. Ganadería Bovina en México.....	04
4.2. Aparato Digestivo de los Rumiantes.....	05
4.3. Digestión de Nutrientes en Rumiantes.....	06
4.4. Sirtuínas.....	09
4.5. Restricción calórica y gluconeogénesis.....	14
4.6. Justificación.....	16
4.7. Hígado.....	17
4.8. Tejidos Adiposos.....	17
4.9. Músculo.....	18
5. Hipótesis.....	19
6. Objetivos.....	19
6.1. Objetivo General.....	19
6.2. Objetivos Específicos.....	19
7. Metodología.....	20
7.1. Obtención de muestras.....	20
7.2. Experimento 1.....	20
7.2.1. Obtención de RNA Total.....	21
7.2.2. PCR Convencional.....	22
7.3. Experimento 2.....	23
7.4. Análisis Estadístico.....	24
8. Resultados.....	25
8.1. Experimento 1.....	25
8.2. Experimento 2.....	27
9. Discusión.....	31
9.1. Experimento 1.....	31
9.2. Experimento 2.....	32

10. Conclusiones.....	36
11. Anexos.....	37
12. Referencias Bibliográficas.....	44

Lista de Cuadros

Cuadro 1. La familia de las sirtuínas.....	12
Cuadro 2. Números de acceso de las secuencias de referencia de las sirtuínas.....	21
Cuadro 3. Primers diseñados y tamaños de los fragmentos predichos y obtenidos.....	25
Cuadro 4. Números de acceso de las secuencias de referencia de Sirt1 y Sirt3 y primers diseñados para PCR en tiempo real.....	27
Cuadro 5. Efecto del tipo de sirtuína y tejido sobre la media de su expresión relativa (mRNA)	30

Lista de Figuras

Figura 1. Vías del metabolismo de los carbohidratos en el rumen.....	07
Figura 2. Metabolismo de los Ácidos Grasos Volátiles.....	08
Figura 3. Filogenia molecular de las sirtuínas.....	10
Figura 4. Curva Estándar de Sirt1.....	28
Figura 5. Curva Estándar de Sirt3.....	29
Figura 6. Curva Estándar de Actina.....	29
Figura 7. Expresión de los genes de las sirtuínas humanas en tejidos de adultos y fetos normales.....	32
Figura 8. Expresión de Sirt1 en ratones alimentados <i>ad libitum</i> (AL) o bajo restricción calórica (CR).....	34

Abreviaturas

aP2	Proteína de unión a ácidos grasos
FoxO1	Factor de transcripción caja O1 de la familia Forkhead
PPAR γ	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma
PGC-1 α	Coactivador 1alfa del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma
AGV's	Ácidos Grasos Volátiles
Sir2	Regulador de información silenciosa 2
Acetil-CoA	Acetil-Coenzima A
AceCS1/2	Acetil-Coenzima A Sintetasa 1/2
H3/4	Histona 3/4
TAF $\subscript{68}$	Subunidad de la RNA Polimerasa I
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
PCAF	Factor asociado a p300/CBP (Proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico)
GDH	Glutamato deshidrogenasa
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
CPS1	Carbamoilfosfato sintasa 1
UCP1	Proteína desacoplante 1
NAD $^+$ /NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido

1. Resumen

Las sirtuínas son desacetilasas que modifican a las histonas, alterando el empaquetamiento del DNA y la transcripción de diferentes genes. Sin embargo, se ha visto que estas proteínas también juegan un papel importante en diversos ciclos metabólicos al alterar los patrones de transcripción de genes involucrados en estos procesos. Se han identificado siete sirtuínas diferentes en humano y otros mamíferos. Las secuencias de los genes de las diferentes sirtuínas en bovino se han predicho, sin embargo, no se conoce la expresión real de estos genes en esta especie, por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar la secuencia de DNA para estas proteínas y medir su expresión en hígado, músculo y tejido adiposo blanco.

En este trabajo se obtuvieron las secuencias de las siete sirtuínas de bovino (Nos. de acceso GenBank GQ166647-GQ166653) con una identidad del 96 al 100% con las secuencias predichas para esta especie. Asimismo, se midió la expresión de Sirt1 y Sirt3 en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo blanco de bovinos adultos y neonatos. Sirt3 mostró una mayor expresión en los tres tejidos de los animales adultos ($P < 0.05$), principalmente en hígado; en contraste, Sirt1 presentó una mayor expresión únicamente en músculo de neonato, comparado con el adulto ($P < 0.0001$). La expresión de las sirtuínas se ha estudiado poco en diferentes especies y los resultados concuerdan con lo reportado para humanos más que para cerdos.

Palabras clave: Sirtuínas, bovinos, expresión, hígado, músculo, tejido adiposo.

2. Abstract

Sirtuins are histone deacetylases that modify the DNA packaging structure and, therefore, gene transcription. However, it has been seen that these proteins also play an important role in diverse metabolic cycles by altering the transcription pattern of genes involved in these mechanisms. There are seven sirtuins that have been identified in humans and other mammals. The gene sequences for bovine sirtuins have been predicted but the real expression pattern of these genes in this species is not yet known. The goal of this project was to identify the DNA sequences for these proteins and to measure their expression in liver, muscle and white adipose tissue.

From this work, the sequences of the seven bovine sirtuins were obtained (GenBank Accession Nos. GQ166647 to GQ166653) with an identity that ranges from 96 to 100% of the predicted ones. Likewise, the expression patterns of Sirt1 and Sirt3 in liver, muscle and white adipose tissue were measured from adult and newborn bovine tissues. Sirt3 presented the highest expression, mainly in liver, of adult bovines ($P < 0.05$), while Sirt1 has a higher expression in newborn muscle, as compared to adult animals ($P < 0.0001$). The expression patterns of sirtuins have been poorly studied in the different species and the results obtained here are more similar to what has been reported for humans than for pigs.

Keywords: Sirtuins, bovine, expression, liver, muscle, adipose tissue.

3. Antecedentes

Investigaciones recientes sobre la regulación génica han revelado que algunos nutrientes pueden modular la expresión de los genes. Recientemente se ha observado el efecto de la ingesta calórica sobre las sirtuínas, que son enzimas que provocan desacetilación y/o ADP-ribosilación, y que están implicadas en la expectativa de vida en gran variedad de organismos. Se ha visto que su función es controlar la transcripción de algunos genes, actuando como coactivadores (Shay y Banz, 2005). En este sentido, observaciones a largo plazo han mostrado que la restricción calórica está asociada con la longevidad y existe la teoría de que el metabolismo y la expectativa de vida comparten rutas celulares comunes.

La gluconeogénesis es la principal ruta metabólica para obtener glucosa en los rumiantes, ya que la absorción de glúcidos a partir del intestino alcanza menos de la mitad del requerimiento (Shimada, 2003), por lo que es fundamental definir en estas especies si las rutas de activación de genes son las mismas que en especies monogástricas, para entender dicho proceso. Por otro lado, los animales rumiantes tienen la capacidad de utilizar los ácidos grasos volátiles (AGV's) como fuente de energía corporal. De hecho, en dichos animales, entre el 50 y 80% de la glucosa disponible a nivel celular proviene del metabolismo de los AGV's, en contraste con un aporte menor al 10% en el caso de animales no rumiantes (Shimada, 2003). Es por esto que en los rumiantes es importante relacionar la gluconeogénesis hepática con la actividad metabólica del tejido adiposo, donde se ha visto que fluye del 10 al 80% de la energía diaria, dependiendo del estado productivo del animal, tipo de alimento y de los requerimientos de energía (Emery, 1979), resultando interesante estudiar dichas enzimas en rumiantes y su expresión en diferentes tejidos para poder establecer la relación entre ambas vías metabólicas.

4. Revisión de Literatura

4.1. Ganadería Bovina en México

La ganadería tiene una gran relevancia en el contexto socioeconómico de México, que en conjunto con el resto del sector primario, ha sido sustento para el desarrollo de la industria pecuaria nacional.

De acuerdo a información del SIAP, se estima que de 2006 a 2008, el hato de bovinos (carne y leche) en México incrementó en 300 mil cabezas, al pasar de 31.1 a 31.4 millones de unidades. Bajo esta dinámica, se estima que en 2009, México contará con un hato ganadero de 31.3 millones de cabezas bovinas, de las cuales 28.9 millones corresponden a carne y doble propósito y 2.3 millones a leche. Se estima un incremento gradual del hato hacia el 2018 y que éste alcance las 32.3 millones de cabezas (SAGARPA, 2009).

En el periodo de 1995 al 2005, se obtuvieron en promedio 1.4 millones de toneladas de carne de bovino en canal. Para 2008 se obtuvieron 1.6 millones de toneladas y se estima que para 2018 la producción se incremente a 1.7 millones de toneladas (SAGARPA, 2009).

La ganadería bovina para carne en el país es la actividad productiva más diseminada en el medio rural y se desarrolla en muy diversas condiciones agroecológicas, influenciadas principalmente por los factores climáticos. Esta variabilidad micro-climática no permite que la ganadería sea homogénea, igualmente la tecnología aplicada es muy variable, existiendo desde las explotaciones tradicionales hasta las que utilizan tecnología de vanguardia. En términos generales, las condiciones bajo las que se desarrolla la ganadería mexicana son extensivas y aproximadamente el 65% de la producción nacional de carne de bovino se finaliza en pastoreo (Ruíz *et al.*, 2004), y aunque existe la finalización en corral de engorda, ésta se realiza de manera limitada por los altos costos de alimentación.

Debido a la importancia de la producción de carne bovina en pastoreo en el país, es necesario optimizar dicha producción. Entendiéndose con esto, que el mercado reciba canales de buena calidad, que sean del agrado del consumidor final, y provenientes de animales sanos.

4.2. Aparato Digestivo de los Rumiantes

Los rumiantes poseen un aparato digestivo que se caracteriza por diferencias morfo-fisiológicas con respecto a otras especies pecuarias.

En los primeros, las principales funciones de la boca son la prensión, la masticación, la insalivación, la deglución y la rumia. La prensión y la masticación consisten en llevar el alimento a la boca y reducir su tamaño mecánicamente. La insalivación sirve para facilitar la masticación y deglución, así como para controlar el pH debido a su capacidad amortiguadora. La deglución es el paso del bolo alimenticio desde la boca hasta el retículo-rumen, a través del esófago. La rumia consiste en la regurgitación y reinsalivación de la ingesta, la remasticación de la porción sólida y la redegglución de la parte líquida y del bolo remasticado (Shimada, 2003).

El estómago de los rumiantes se caracteriza por tener varias divisiones, las cuales son: 1) rumen, 2) retículo, y 3) omaso, que son pre-estómagos, y 4) abomaso, el cual es el estómago verdadero.

El rumen y el retículo se consideran, desde el punto de vista fisiológico-digestivo, como una sola cavidad debido a que están separados únicamente por el pliegue retículo-ruminal y a que la ingesta puede pasar de un lado al otro de forma libre. Este órgano se caracteriza por ser una gran cámara de fermentación anaeróbica, la cual se lleva a cabo gracias a la presencia de una variada población de microorganismos, formada por bacterias, protozoos y hongos. En esta cámara, el alimento se separa en tres estratos: superior (partículas gruesas y alimento del día), medio (partículas de densidad y tamaño intermedios) e inferior (líquidos, partículas finas y alimento del día anterior). La fermentación bacteriana es un proceso lento, por lo que las partículas de fibra permanecen en el rumen de 20 a

48 horas. En este sitio se lleva a cabo la absorción de ácidos grasos volátiles (AGV's).

Las partículas más pequeñas de la digesta (< 1-2 mm), encontradas en la parte inferior del retículo-rumen, pasan hacia el omaso. En esta cavidad se lleva a cabo la absorción de agua y minerales hacia el torrente sanguíneo.

El abomaso o estómago verdadero tiene función glandular similar al estómago de los animales no rumiantes. Aquí se secretan ácido clorhídrico y pepsinógeno, con lo que se inicia la degradación de las proteínas alimenticias y microbianas. La existencia de pliegues abomasales y la naturaleza semilíquida de la ingesta favorecen el proceso hidrolítico, reduciendo el tiempo necesario para éste.

Al igual que en los animales no rumiantes, la ingesta pasa hacia el intestino delgado, donde se lleva a cabo la digestión y absorción de nutrientes y microbios ruminales. Este proceso se lleva a cabo de forma continua. El intestino grueso se encarga de finalizar la fermentación, produciendo y absorbiendo AGV's, aunque en menor proporción que en el retículo-rumen, además de absorber agua.

4.3. Digestión de Nutrientes en Rumiantes

Los forrajes que consumen los rumiantes se caracterizan por estar compuestos por carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina) y carbohidratos de reserva (fructosanos y almidones) (Shimada, 2003).

Los microorganismos tienen la capacidad de producir las enzimas necesarias para la degradación de estos carbohidratos, siendo su principal materia prima para la obtención de energía y carbono.

El catabolismo de los polisacáridos implica su degradación hasta oligosacáridos de cadena corta o monosacáridos, obteniéndose como principal producto a la glucosa (Grudsky, 1983). La mayor parte de esta glucosa es utilizada por los microorganismos ruminales, dejando pequeñas cantidades disponibles como fuente de energía para el animal rumiante.

La glucosa que no utilizan los microbios es convertida en piruvato por medio de glucólisis y, posteriormente, transformada en AGV's, dióxido de carbono y metano (Figura 1).

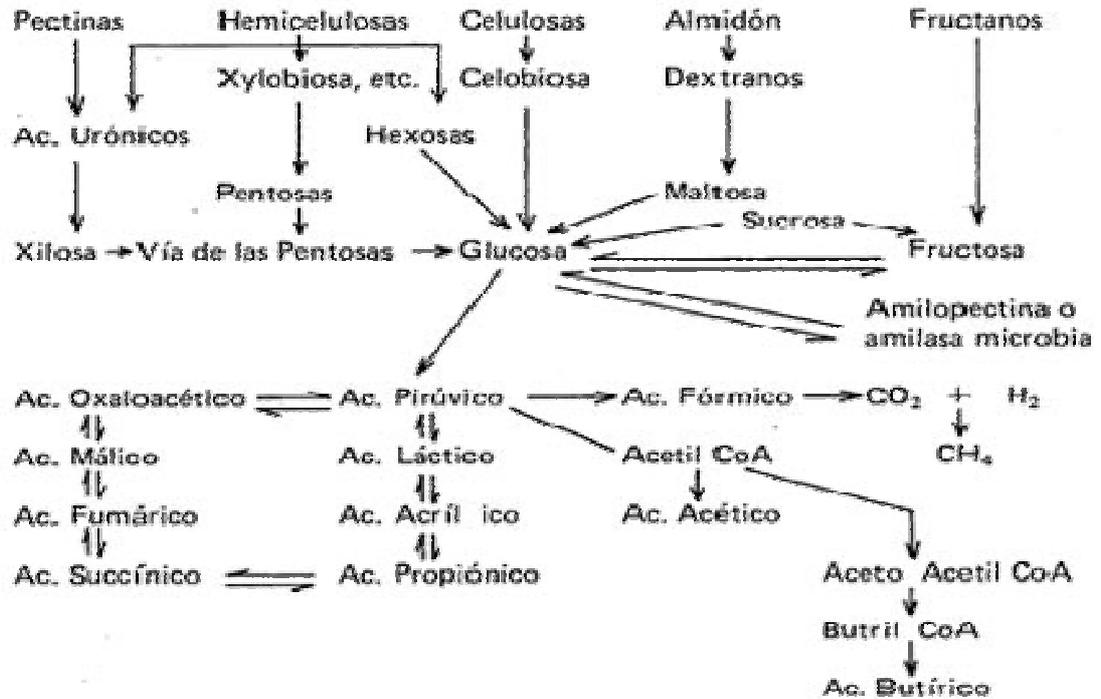


Figura 1. Vías del metabolismo de los carbohidratos en el rumen (Grudsky, 1983).

Los AGV's son absorbidos a través de la pared ruminal (76%) a una velocidad similar a su velocidad de producción, siendo el butirato el que se absorbe a mayor velocidad. Estos AGV's representan el 80% de la energía fermentada en el rumen, mientras que el resto de esta energía se pierde en forma de calor y metano (Grudsky, 1983).

En el epitelio ruminal, antes de pasar a la circulación portal, el 5% del ácido propiónico se transforma en ácido láctico y cerca del 50% del ácido butírico se transforma en ácido beta-hidroxibutírico (Shimada, 2003). El ácido acético proporciona el mayor porcentaje de la energía requerida por el rumiante, constituyendo el 90% de la concentración de AGV's en la sangre periférica. El propionato es transportado al hígado, donde junto a los aminoácidos no esenciales, constituye la principal fuente de glucosa, vía gluconeogénesis. La pequeña

La urea, constituyente de la dieta o procedente del torrente sanguíneo y de la saliva, entra continuamente en el rumen y es una importante fuente de nitrógeno para el crecimiento y la síntesis de las proteínas microbianas ruminales. En el rumen es degradada a amoníaco y dióxido de carbono (Grudsky, 1983).

En el caso de los lípidos, la microbiota ruminal se encarga de hidrolizar a los glicéridos y fosfolípidos para obtener ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos son utilizados por los microbios para la síntesis de sus lípidos estructurales o abandonan el rumen y el glicerol es fermentado, formándose ácido propiónico (Shimada, 2003).

4.4. Sirtuínas

Las sirtuínas son las enzimas homólogas de Sir2 en mamíferos; el cual es el regulador de información silenciosa 2, caracterizado inicialmente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Las sirtuínas pertenecen a la familia de las desacetilasas de histonas (proteínas que se unen al DNA para poder compactarse, formando a los cromosomas).

En humanos y otros mamíferos se han caracterizado distintas desacetilasas de histonas que han sido agrupadas en tres clases basándose en su homología con las desacetilasas de histonas de *Saccharomyces cerevisiae*: RPD3 (clase I), HDA1 (clase II) y el regulador de información silenciosa (Sir) 2 (clase III). A su vez, la clase III se ha dividido en cinco subclases (I – IV y U). Las subclases I y IV se dividen en tres y dos subgrupos, respectivamente. Las sirtuínas de la subclase U se encuentran únicamente en las bacterias Gram-positivas (Figura 3) (North y Verdin, 2004).

Sir2 y los miembros de su familia están altamente conservados en procariontes y eucariontes. Esta familia se caracteriza por tener un dominio de aproximadamente 260 aminoácidos con un alto grado de similitud en la secuencia de todas las sirtuínas.

El genoma de *S. cerevisiae* codifica cinco sirtuínas, Sir2p y cuatro proteínas adicionales llamadas “homólogos de Sir2” (Hst1p – Hst4p). El genoma humano codifica siete sirtuínas, las cuales se encuentran clasificadas dentro de las subclases I a IV (North y Verdín, 2004).

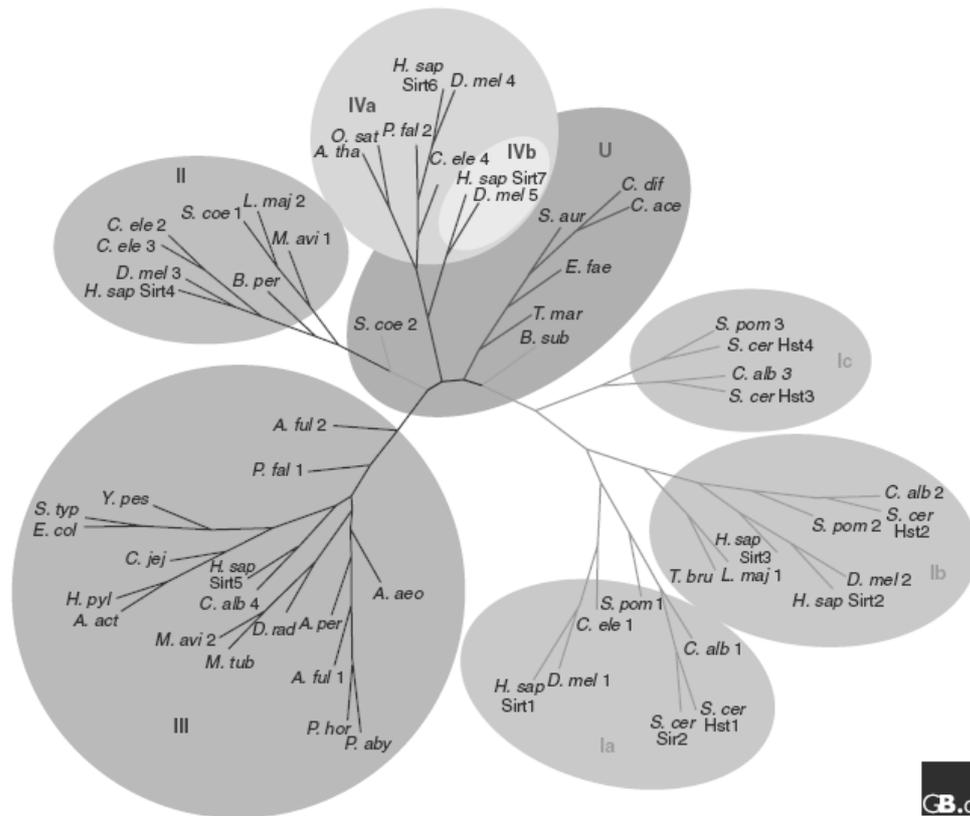


Figura 3. Filogenia molecular de las sirtuínas (North y Verdín, 2004).

Inicialmente toda la investigación se centró en su acción sobre las histonas y, por tanto, sobre la expresión génica. Sin embargo, hallazgos recientes han generalizado el concepto de la acetilación reversible a muchas proteínas no histonas (Sternier y Berger, 2000). La acetilación reversible de proteínas es una modificación post-transcripcional crítica, involucrada en la regulación de muchos procesos biológicos (Schwer, 2002). Adicionalmente, algunas sirtuínas pueden actuar como ADP-Ribosiltransferasas.

La actividad de estas proteínas es dependiente de NAD⁺ (nicotinamida adenín dinucleótido, en su forma oxidada), una coenzima óxido-reductora necesaria para el transporte de electrones y, por tanto, para la obtención de energía.

Las proteínas Sir2 producen efectos tales como alteración de la estructura de la cromatina, silenciamiento de genes, modulación del ciclo celular, disminución de la recombinación de rDNA y disminución de la tasa de envejecimiento (Frye, 2000). Además, se ha visto que estas proteínas juegan un papel importante en diversos ciclos metabólicos al alterar los patrones de transcripción de genes involucrados en estos procesos. Similar a la Sir2 de levadura, los genes de las sirtuínas de mamífero pueden también mediar el efecto de la restricción calórica en el metabolismo (Shi *et al.*, 2005).

Cada sirtuína (de mamíferos) tiene una localización característica dentro de la célula. Así, Sirt1 y Sirt6 se encuentran en el núcleo; Sirt2 se desplaza del citoplasma al núcleo durante la división celular; Sirt3, Sirt4 y Sirt5 son sirtuínas mitocondriales; Sirt7 se encuentra en el nucléolo (Saunders y Verdin, 2007).

Las proteínas blanco de las sirtuínas son, para Sirt1, principalmente factores de transcripción relacionados con el metabolismo celular y con la respuesta al estrés oxidativo, como FoxO1, PGC-1 α , p53, AceCS1 (North y Sinclair, 2007; Saunders y Verdin, 2007; Shoba *et al.*, 2009). Sirt2 desacetila en el citoplasma a los microtúbulos para la formación del huso mitótico y en el núcleo a las histonas para la formación de los cromosomas mitóticos (Saunders y Verdin, 2007). Sirt3 desacetila a la Acetil-CoA Sintetasa 2 (AceCS2), mediante la cual se transforma acetato en Acetil-CoA; a la isocitrato deshidrogenasa, catalizando la transformación de isocitrato en α -cetoglutarato; y a la glutamato deshidrogenasa para activar la secreción de insulina mediada por aminoácidos en hígado (North y Sinclair, 2007; Saunders y Verdin, 2007). Sirt4, la cual puede actuar como ADP-Ribosiltransferasa, inhibe a la glutamato deshidrogenasa en las células β del páncreas (Argmann y Auwerx, 2006). Sirt5 actúa sobre la carbamoil-fosfato-sintetasa 1, regulando el ciclo de la urea (Nakagawa *et al.*, 2009). Sirt6 desacetila a la histona 3 y a la DNA Polimerasa β , jugando un papel importante en la

reparación del DNA por el método de escisión de bases y promoviendo, por tanto, la estabilidad genómica. Además, se ha observado que esta sirtuína puede actuar sobre sí misma como ADP-Ribosiltransferasa (Rodgers y Puigserver, 2006). La última sirtuína, Sirt7, tiene como principal blanco a la RNA Polimerasa I, activando la transcripción del DNA ribosomal (Saunders y Verdin, 2007). En el Cuadro 1 se observan los genes hasta ahora conocidos.

Cuadro 1. La familia de las sirtuínas (Modificado de Frye 2000, Shi *et al.* 2005, Rogers *et al.* 2005).

Gen	Localización subcelular	Dianas	Actividad
Sir2 (Levadura)	Nucléolo	Histona H3	Desacetilasa
Cob2		Acetil-CoA sintetasa	Desacetilasa
Archael Sir2		Alba	Desacetilasa, ADP-ribosiltransferasa
dSir2 (Drosophila)	Núcleo	Histona H4	Desacetilasa
Sirt1	Núcleo PLM bodies	H3, H4, p53, TAFI68, PCAF/MyoD, AceCS1	Desacetilasa
Sirt2	Núcleo Citoplasma	Tubulina	Desacetilasa
Sirt3	Mitocondrias	AceCS2, GDH, ICDH	Desacetilasa
Sirt4	Mitocondrias	GDH	ADP-Ribosiltransferasa
Sirt5	Mitocondrias	CPS1	Desacetilasa
Sirt6	Núcleo	Sirt6, H3, DNA Pol β	ADP-Ribosiltransferasa
Sirt7	Nucléolo	RNA Polimerasa	Desacetilasa

Diversos estudios han mostrado que las sirtuínas tienen relevancia patofisiológica en las enfermedades neurodegenerativas, la diferenciación muscular, la inflamación, la obesidad y el cáncer.

Sirt1 tiene funciones fisiológicas prominentes en el hígado, músculo, páncreas, testículos, ovarios y tejidos adiposos, entre las que se cuentan la regulación de la proliferación y supervivencia celular, así como de la apoptosis. Además, reduce la apoptosis inducida por estrés bajo condiciones de restricción calórica, prolongando de esta forma la vida celular. Se ha observado que, bajo ciertas condiciones

fisiológicas y patológicas, Sirt1 se puede transportar del núcleo al citoplasma como parte del mecanismo regulador de la muerte y diferenciación celulares (Shoba *et al.*, 2009).

Sirt2 presenta actividad en cerebro, corazón, testículos y tejido muscular esquelético. Es una proteína citoplásmica oligodendroglial y se localiza en la vaina de mielina (Shoba *et al.*, 2009)..

La función fisiológica de Sirt3 se presenta en las mitocondrias de corazón, cerebro, testículos, hígado, riñón, músculo y tejidos adiposos. Sirt3 incrementa la respiración mitocondrial al estimular al cAMP, favoreciendo la glucogenólisis. Estudios realizados en humanos han mostrado que Sirt3 está relacionada con la longevidad (Shoba *et al.*, 2009)..

Sirt4 se expresa en todos los tejidos, presentando los mayores niveles en corazón, cerebro, riñón, hígado y páncreas. Fisiológicamente actúa como una proteína intracelular reguladora del metabolismo en hepatocitos y células β del páncreas (Shoba *et al.*, 2009).

La actividad bioquímica y funciones celulares de Sirt5 no han sido estudiadas a fondo. Sin embargo, Nakagawa *et al.* (2009) demostraron que esta proteína actúa específicamente sobre la carbamoil fosfato sintetasa 1 (CPS1), la principal enzima que regula el ciclo de la urea, activándose bajo condiciones de ayuno o cuando hay consumo prolongado de dietas altas en proteína. Esta función específica resalta el fuerte vínculo que existe entre las sirtuínas y el metabolismo.

Sirt6 se encuentra ampliamente distribuida en todos los tejidos. Entre sus funciones destacan la modulación de la cromatina telomérica y la regulación de la estabilidad genómica a través de su función en la reparación por escisión de bases cuando hay daños en DNA de cadena sencilla.

Sirt7 se encuentra en tejidos altamente proliferativos como son el bazo, los ovarios, la tiroides, el hígado y los testículos. En contraste, su expresión es nula o baja en tejidos no proliferativos como son el corazón, el cerebro y el músculo. Sirt7 es un

activador la transcripción de rRNA y puede regular el crecimiento y la supervivencia celulares, al igual que al metabolismo (Shoba *et al.*, 2009).

4.5. Restricción calórica y gluconeogénesis

En rumiantes, la gluconeogénesis es la principal ruta metabólica para obtener glucosa. A través de esta vía se sintetiza glucosa partiendo de precursores diferentes a los carbohidratos, por ejemplo el ácido láctico, el glicerol, los aminoácidos gluconeogénicos (principalmente alanina), algunos intermediarios del Ciclo de Krebs y, en los rumiantes, el ácido propiónico (Shimada, 2003).

La gluconeogénesis se activa durante los periodos de ayuno, subalimentación y cuando la glucosa obtenida en el alimento no es suficiente para cubrir el requerimiento celular.

Durante el ayuno (incluso de horas) existen cambios metabólicos, hormonales y de expresión de proteínas reguladoras. Por ejemplo, los niveles de glucosa en sangre bajan, la secreción de insulina disminuye e incrementa la del glucagón, lo que activa la gluconeogénesis y la glucogenólisis hepática, así como la movilización de triacilglicéridos del tejido adiposo. Durante el ayuno prolongado se ha observado un incremento en la producción de cuerpos cetónicos a nivel hepático, los cuales pueden ser usados como fuente de energía por el sistema nervioso central, mientras que en el músculo, los glucocorticoides inducen la gluconeogénesis, reduciendo la utilización de glucosa (Bordone y Guarente, 2005).

Numerosos estudios han demostrado que una reducción moderada (20-50%) en la ingestión de calorías o subalimentación, combinada con el consumo adecuado de los nutrientes esenciales, puede aumentar la expectativa de vida y reducir la presentación de enfermedades crónicas asociadas a la edad (Bordone y Guarente, 2005). Estos efectos han sido observados en diversas especies que van desde las levaduras hasta roedores y peces (Weindruch y Walford, 1988). La restricción calórica parece tener efectos sobre el sistema inmune, el potencial de proliferación celular, el metabolismo, la reparación de DNA, los niveles de enzimas

antioxidantes, la estructura de la cromatina, y la síntesis y el recambio proteicos (Walford *et al.*, 1987).

La restricción calórica es la única manipulación experimental con la que se ha demostrado un retraso en el envejecimiento de mamíferos y, debido a que tiene un efecto sobre la mayoría de los tejidos, es posible que la modulación del envejecimiento pueda ocurrir por medio de procesos celulares que afectan a todas las células del organismo. Uno de estos procesos es la expresión génica, que al sufrir cambios puede afectar el estado metabólico de un organismo y viceversa; por otro lado, la expresión génica se altera con la edad. Estudios realizados en los años 80's y 90's indican que la restricción calórica altera la expresión de una variedad de genes, y se piensa que son estas alteraciones las que prolongan la supervivencia y disminuyen la aparición de patologías en animales bajo restricción calórica (Han y Hickey, 2005).

Entre los biomarcadores de la restricción calórica se cuentan la concentración de insulina y glucosa durante el ayuno, temperatura corporal y los niveles de especies reactivas de oxígeno.

En investigaciones recientes, se ha sugerido que las enzimas Sir2 o sirtuínas pueden estar ampliamente relacionadas con los mecanismos de respuesta celulares a la restricción calórica y, por tanto, con la gluconeogénesis hepática.

Existen dos factores reguladores de la transcripción que son blancos de la insulina y que pueden activar la gluconeogénesis hepática, estos son FoxO1 y PGC-1 α .

FoxO1 se une directamente a los promotores de los genes gluconeogénicos y activa el proceso de producción de glucosa, además es directamente fosforilado por una cinasa que regula al receptor de la insulina. Frescas *et al.* (2005) observaron que la desacetilación es un modulador positivo de la función de FoxO1, ya que FoxO1 es regulado por la producción de glucosa hepática y es afectado por el resveratrol, un activador de las sirtuínas, sin embargo, sus datos no son concluyentes respecto a la diferencia entre animales ayunados o no.

PGC-1 α se induce en el hígado ayunado y está elevado en diversos tipos de diabetes, así como en la deficiente señalización de la insulina, su expresión a

niveles fisiológicos se incrementa en la gluconeogénesis (Puigserver *et al.*, 2003; Yubero *et al.*, 2004).

En el tejido adiposo, se sabe que PPAR γ es un regulador de la adipogénesis, el cual activa genes específicos en dicho tejido, uno de ellos es aP2, que codifica para una proteína que colabora en el almacenamiento de la grasa. Sirt1 es un represor de PPAR γ y en ratones ayunados se ha visto que Sirt1 se une al promotor de aP2 en el tejido adiposo blanco, reprimiendo la expresión génica y promoviendo la movilización de grasa de dicho tejido hacia la sangre (Picard *et al.*, 2004).

Otros reportes muestran que el incremento en la proteína Sirt1 responde a la restricción de alimento (Cohen *et al.*, 2004).

En el caso de los rumiantes, por el metabolismo bacteriano, la glucosa absorbida a nivel intestinal por estos animales es muy poca, por lo que dependen de la gluconeogénesis hepática para cubrir sus necesidades celulares de glucosa, utilizando como sustratos principalmente a los AGV's. Se ha demostrado que el propionato de la fermentación ruminal aporta del 43 al 67% del carbono usado para la síntesis de glucosa en el hígado y que el lactato aporta hasta el 12% (Huntington, 1999).

4.6. Justificación

Las sirtuínas han sido estudiadas en varios organismos, desde levaduras hasta roedores, peces y humanos. Sin embargo, en bovinos no han sido analizadas. En el caso de esta especie, las secuencias de las siete sirtuínas estaban publicadas en el banco genético (GenBank, NCBI) únicamente como secuencias predichas a través de métodos computacionales. El objetivo de este trabajo fue obtener las secuencias reales con métodos de biología molecular y medir la expresión de Sirt1 y Sirt3 por estar involucradas en el metabolismo en el hígado, músculo y tejido adiposo blanco, los principales tejidos con actividad metabólica.

Además, resulta importante conocer el efecto de las sirtuínas sobre la gluconeogénesis hepática en los rumiantes, usando como modelo a los bovinos, para contribuir al entendimiento de su metabolismo energético. También es fundamental localizar nutrientes que actúen como ligandos de los factores de transcripción de genes específicos que controlan la gluconeogénesis y la lipólisis en los bovinos.

4.7. Hígado

Sirt1 regula la gluconeogénesis y la glucólisis en el hígado bajo condiciones de restricción calórica. Activa al PGC-1 α con la subsecuente activación de la glucosa-6-fosfatasa, enzima gluconeogénica, y represión de la glucólisis y la desacetilación de AceCS1. También regula la gluconeogénesis a través de la actividad de AceCS2, favoreciendo la formación de Acetil-CoA e incrementando la proporción de Acetil-CoA:CoA, reduciendo, como resultado, la actividad de la piruvato deshidrogenasa. Asimismo, Sirt1 estimula la secreción de insulina al reprimir a la proteína desacoplante 2. Se ha observado que su expresión se encuentra reducida cuando existe la enfermedad del hígado no alcohólico graso. Sirt3 regula la termogénesis al incrementar la respiración mitocondrial de las células hepáticas.

4.8. Tejidos Adiposos

En el caso del tejido adiposo blanco, Sirt1 y Sirt3 participan en la regulación de la grasa en el cuerpo. Durante la restricción calórica, Sirt1 es regulada positivamente, reprimiendo a PPAR γ y promoviendo la movilización hacia la sangre de grasa proveniente del tejido adiposo. La inhibición de Sirt1 en los adipocitos induce la sensibilización a insulina, resultado similar al obtenido mediante los ligando de PPAR γ . Los cambios en la expresión de Sirt1 durante la restricción calórica prolongada producen una mayor sensibilidad a insulina al incrementar la β -oxidación de ácidos grasos, con lo que se disminuyen los niveles de ácidos grasos libres circulantes. En el tejido adiposo marrón, Sirt3 promueve la expresión de

UCP1 de la membrana mitocondrial interna, con lo que se reduce el gasto energético.

4.9. Músculo

Las sirtuínas juegan un papel fisiológico en la regulación de la expresión génica y la diferenciación muscular al detectar cambios en la relación $[NAD^+]/[NADH]$. Sirt1 suprime la diferenciación de mioblastos al desacetilar y, por tanto, inhibir, al factor de transcripción MyoD. En músculo esquelético, Sirt1 regula los cambios metabólicos por medio de la desacetilación de PGC-1 α , el cual es necesario para la activación de los genes de la oxidación de ácidos grasos en las mitocondrias. Además, inhibe a los andrógenos y regula la función del receptor androgénico mediante desacetilación y transcripción, influenciando de esta forma la masa muscular. También actúa como principal represor de la proteína desacoplante 3, la cual juega un papel importante en la protección contra ácidos grasos excesivos en las células musculares, reduciendo el potencial de membrana de las mitocondrias y la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (Shoba *et al.*, 2009).

5. Hipótesis

El patrón de expresión de las sirtuínas en bovinos es diferente al de especies no rumiantes y éste cambia con la edad.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Caracterizar molecularmente las sirtuínas bovinas y determinar la expresión de Sirt1 y Sirt3 en hígado, músculo y tejido adiposo de adultos y neonatos.

6.2. Objetivos específicos

- 1.- Clonar y secuenciar Sirt1, Sirt2, Sirt3, Sirt4, Sirt5, Sirt6 y Sirt7 de la especie bovina.
- 2.- Medir la expresión de Sirt1 y Sirt3 en hígado, músculo y tejido adiposo blanco de bovino adulto y neonato mediante PCR en tiempo real.

7. Metodología

7.1. Obtención de Muestras

Los experimentos diseñados se realizaron con muestras de tejidos de bovinos adultos en edad de sacrificio y bovinos neonatos de 2 a 5 días de edad. Dichas muestras se colectaron en el Rastro Municipal del Estado de Querétaro y correspondieron a hígado, músculo, tejido adiposo blanco (subcutáneo), riñón, corazón, pulmón y testículo de seis animales elegidos al azar para cada edad. Estas muestras fueron colocadas en nitrógeno líquido para ser transportadas al laboratorio, donde se almacenaron a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

7.2. Experimento 1: Clonar y secuenciar Sirt1, Sirt2, Sirt3, Sirt4, Sirt5, Sirt6 y Sirt7 de la especie bovina.

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden obtener copias de fragmentos específicos de DNA, correspondientes al gen que se está estudiando. Estos fragmentos pueden ser secuenciados, mediante técnicas estandarizadas.

Para poder realizar el PCR, se diseñan oligonucleótidos (también conocidos como oligos, primers o cebadores) para el gen deseado empleando secuencias reportadas para varias especies o predichas para la especie deseada. En este caso, las secuencias de las sirtuínas de bovino se encontraban predichas en el banco de datos genético GenBank. Las secuencias que se utilizaron como referencia se encuentran resumidas en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Números de acceso de las secuencias de referencia de las sirtuínas.

Sirtuína	No. de acceso de secuencia de referencia	Estado	Tipo de molécula
Sirt1	XM_864818.2	Predicha	Análisis Computacional
Sirt2	XM_001790319.1	Predicha	Análisis Computacional
Sirt3	XM_873980.3	Predicha	Análisis Computacional
Sirt4	BC116055.1	Reportada	Clon de mRNA
Sirt5	BC103176.1	Reportada	Clon de mRNA
Sirt6	BC140592.1	Reportada	Clon de mRNA
Sirt7	BC120328.1	Reportada	Clon de mRNA

7.2.1. Obtención de RNA Total

Una vez diseñados los oligonucleótidos, se procedió al procesamiento de las muestras. Utilizando el kit RNeasy Mini Kit de Qiagen se obtuvo el RNA total de las muestras. Una vez que se tiene el RNA, se mide su concentración con el espectrofotómetro NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). Los valores obtenidos son, por un lado, la concentración de ácido nucleico en ng/ μ L y por otro lado, las relaciones entre las absorbancias -de la muestra- a 260 y 280 nm, así como a 260 y 230 nm. La relación 260/280 indica la pureza del ácido nucleico, estando los valores de pureza de RNA alrededor de 2.0. La relación 260/230 es un indicador secundario de la pureza de los ácidos nucleicos y comúnmente se encuentra en el rango de 1.8-2.2. La obtención de valores menores a estos indica la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes.

Paralelamente, se analiza la integridad de los RNAs obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa.

7.2.2. PCR Convencional

Después de comprobar la integridad y pureza del RNA obtenido, se procedió a realizar la transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa. El objetivo de esto es obtener, a partir de RNA de una hebra y sensible al calor, DNA complementario (cDNA), el cual es más estable a diferentes temperaturas. Esta transcripción reversa se puede llevar a cabo utilizando oligonucleótidos específicos del gen deseado, con oligonucleótidos seleccionados al azar o con el llamado "oligo dT". En este caso, se empleó el oligo dT, el cual se une al extremo 3' de la región sin traducir, la cual tiene una cola de poli-adeninas (poli-As) característica de los mRNAs, y que, junto a la enzima Transcriptasa Reversa, va a producir la hebra que complementa a estos RNAs. Esto va a permitir obtener los fragmentos correspondientes a todos los mensajeros para realizar estudios de expresión de uno o varios genes y sus proteínas.

Después de obtener el cDNA, se procede a realizar el PCR. Esta técnica consiste en la utilización de termociclos para, en primer lugar, separar las dos cadenas del DNA a temperaturas altas, y en segundo lugar, realizar copias de estas cadenas a bajas temperaturas, mediante el uso de los primers diseñados específicamente para el gen de estudio y de la enzima Taq Polimerasa, la cual es termoestable y va a sintetizar el DNA con la presencia de trifosfatos de deoxinucleótidos (dNTP's).

El PCR se llevó a cabo inicialmente con los diferentes tejidos de bovino adulto y bajo diferentes condiciones de temperatura y de concentración de los diferentes reactivos para poder encontrar las condiciones (tejido y reactivos) que más favorezcan la reacción.

Para verificar el producto de PCR se utiliza la electroforesis en gel de agarosa. Para corroborar que el fragmento obtenido corresponde al número de pares de bases que se desea obtener, se utiliza un marcador de peso molecular estandarizado.

Para comprobar la identidad de los productos de PCR se secuenciaron. Para esto se emplea el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos, llevado a cabo en la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología. Para finalizar,

se comprueba la identidad de las secuencias utilizando el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI.

7.3. Experimento 2: Medir la expresión de Sirt1 y Sirt3 en hígado, músculo y tejido adiposo blanco de bovino adulto y neonato mediante PCR en tiempo real.

En este experimento de expresión génica se empleó la técnica de PCR en tiempo real. Esta técnica se basa en el principio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descrito previamente. Su principal característica es que permite cuantificar la cantidad de DNA existente durante el proceso de amplificación, usando fluorescencia, de forma que su aumento es proporcional a la cantidad de DNA formado.

La fluorescencia se obtiene mediante el uso de fluorocromos no específicos, así, el DNA que se va multiplicando con cada ciclo se une al fluorocromo, generalmente Sybr Green, produciendo fluorescencia, la cual es medida por el termociclador especial para PCR en tiempo real. Los primers se diseñan al igual que los descritos anteriormente, a partir de secuencias reportadas para varias especies o predichas para la especie de interés, con la diferencia de que los fragmentos de DNA que amplificarán deben ser más pequeños (180-300 pb).

Para poder llevar a cabo la curva standard se empleó un producto de PCR, el cual se obtuvo empleando el tejido y las condiciones encontradas durante el experimento anterior. Este producto de PCR fue secuenciado para confirmar que es el producto deseado. Se midió la concentración de DNA de este producto con el NanoDrop y con ayuda de un programa para cálculo de peso molecular de DNA (Martínez-Conde y Mayor) se pudo calcular el número de copias por microlitro, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Copias}/\mu\text{L} = \frac{[\text{DNA, ng}/\mu\text{L}] * (1 \times 10^{-9})}{\text{PM, Da}} * 6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas}$$

Las diluciones empleadas para la curva fueron 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^2 , a partir de una concentración de 10^{12} .

Una vez obtenida la curva de calibración, se realizaron las pruebas de expresión en las muestras de hígado, músculo y tejido adiposo blanco de los doce animales (6 adultos y 6 neonatos) del rastro.

Para obtener los valores de expresión, se obtiene la conocida delta- C_T , mediante la cual se compara la expresión de nuestro gen blanco con un punto conocido de la curva standard producto de PCR de la gen de interés. Las fórmulas para obtener este valor son:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Gen blanco}) - C_T (\text{Gen Referencia})$$

$$\text{Expresión Relativa} = 2^{-\Delta C_T}$$

Por otro lado, se realizó una cuantificación relativa comparando con la expresión del gen de β -actina como gen de referencia.

7.4. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SAS®, empleando un diseño completamente al azar con arreglo factorial, con lo cual se pueden medir las diferencias en la expresión de las dos sirtuínas en los tres tejidos.

$$y_{ij} = \mu + S_i + E_j + (SE)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

donde: y_{ij} = Expresión relativa de la sirtuína i a la edad j

μ = Media general

S_i = Efecto de la i -ésima sirtuína

$i = 1$ Sirt1, 2 Sirt3

E_j = Efecto de la j -ésima edad

$j = 1$ neonato, 2 adulto

$(SE)_{ij}$ = Interacción entre la sirtuína i y la edad j

ε_{ij} = Error experimental

8. Resultados

8.1. Experimento 1: Clonar y secuenciar Sirt1, Sirt2, Sirt3, Sirt4, Sirt5, Sirt6 y Sirt7 de la especie bovina.

El diseño de oligonucleótidos utilizados para la obtención de los productos de PCR fue a partir de las secuencias predichas de las sirtuínas de bovino que se encuentran en el GenBank. Los números de acceso de las secuencias empleadas y los primers diseñados se resumen en el siguiente cuadro.

Cuadro 3. Primers diseñados y tamaños de los fragmentos predichos y obtenidos.

Sirtuína	Primer Forward Localización	Primer Reverse Localización	Tamaño del fragmento a obtener	Tamaño del fragmento obtenido
Sirt1	ATACACTGGAGCAGGTT 1031-1047	TTCATCAGCTGGGCATCTAG 1175-1194	164 pb	173 pb 1022-1194
Sirt2	GAGAAGATCTTCTCCGA 710-726	GAAATGTTCTGAGCTCCCCA 1340-1359	650 pb	648 pb 710-1357
Sirt3	AAGCATGGCGTTGTTTCCTC 46-65	AAACGTGCCCGAGCTCTTC 1120-1138	1093 pb	616 pb 46-655
Sirt4	AGAGATGTTGCTTTGCCGCC 266-285	AGAGATGTTGCTTTGCCGCC 1105-1124	859 pb	594 pb 531-1124
Sirt5	TGGGGAGAGGAATGCAACAC 88-107	TTGGATTCCAGCCCAGCAAT 1162-1181	1094 pb	1094 pb 88-1182
Sirt6	TTAACTTGGGGCCTATGGAG 1258-1277	TTAGGCTGAAAATCAGGGAG 1399-1418	161 pb	231 pb 1257-1484
Sirt7	CGTAACCTGGTGCTTGACCA 1205-1224	TCAGGGTGAAAATGTCACCC 1318-1337	133 pb	133 pb 1205-1337

Utilizando estos primers se realizó la amplificación de los genes de interés mediante la técnica de PCR, dichos productos fueron secuenciados con el Abi Prism 310 Genetic Analyzer, obteniéndose los siguientes fragmentos de las secuencias para las Sirtuínas bovinas:

Sirt1: Se obtuvo un fragmento de 173 pares de bases, el cual se localiza en la región comprendida entre los nucleótidos 1022 y 1194 de la secuencia de

referencia XM_864818.2. Dicha secuencia fue reportada en el GenBank del NCBI con número de acceso GQ166647 (Ver anexos).

Sirt2: Se obtuvo un fragmento de 648 pares de bases, el cual se localiza en la región comprendida entre los nucleótidos 710 y 1357 de la secuencia de referencia XM_001790319.1. Dicha secuencia fue reportada en el GenBank del NCBI con número de acceso GQ166648 (Ver anexos).

Sirt3: Se obtuvo un fragmento de 616 pares de bases, el cual se localiza en la región comprendida entre los nucleótidos 46 y 655 de la secuencia de referencia XM_873980.3. Dicha secuencia fue reportada en el GenBank del NCBI con número de acceso GQ166649 (Ver anexos).

Sirt4: Se obtuvo un fragmento de 594 pares de bases, el cual se localiza en la región comprendida entre los nucleótidos 531 y 1124 de la secuencia de referencia BC116055.1. Dicha secuencia fue reportada en el GenBank del NCBI con número de acceso GQ166650 (Ver anexos).

Sirt5: Se obtuvo un fragmento de 1094 pares de bases, el cual se localiza en la región comprendida entre los nucleótidos 88 y 1182 de la secuencia de referencia BC103176.1. En este caso el fragmento obtenido corresponde a toda la región codificante. Dicha secuencia fue reportada en el GenBank del NCBI con número de acceso GQ166651 (Ver anexos).

Sirt6: Se obtuvo un fragmento de 231 pares de bases, el cual se localiza en la región comprendida entre los nucleótidos 1257 y 1484 de la secuencia de referencia BC140592.1. En este caso el fragmento obtenido se encuentra fuera de la región codificante, por lo que no se obtuvo fragmento de la secuencia de aminoácidos. Dicha secuencia fue reportada en el GenBank del NCBI con número de acceso GQ166652 (Ver anexos).

Sirt7: Se obtuvo un fragmento de 133 pares de bases, el cual se localiza en la región comprendida entre los nucleótidos 1205 y 1337 de la secuencia de referencia BC120328.1. En este caso el fragmento obtenido también se encuentra fuera de la región codificante y, por tanto, no se obtuvo secuencia de aminoácidos. Dicha secuencia fue reportada en el GenBank del NCBI con número de acceso GQ166653 (Ver anexos).

Los tejidos empleados para obtener los productos de PCR, a partir de los cuales se obtuvieron estos fragmentos de las secuencias, fueron testículo para Sirt1, Sirt2 y Sirt4, y riñón para Sirt3, Sirt5, Sirt6 y Sirt7.

La traducción de las secuencias obtenidas se realizó mediante la herramienta disponible en la página de Justbio, empleando la traducción para los seis marcos de lectura. Las secuencias de aminoácidos reportadas corresponden al marco de lectura abierto más completo.

8.2. Experimento 2: Medir la expresión de Sirt1 y Sirt3 en hígado, músculo y tejido adiposo blanco de bovino adulto y neonato mediante PCR en tiempo real.

Los oligonucleótidos diseñados para realizar los PCRs en tiempo real se obtuvieron a partir de las secuencias predichas en el GenBank para las sirtuínas Sirt1 y Sirt3 de bovino. Los números de acceso de las secuencias empleadas y los primers diseñados se presentan en la siguiente tabla.

Cuadro 4. Números de acceso de las secuencias de referencia de Sirt1 y Sirt3 y primers diseñados para PCR en tiempo real.

Sirtuína	No. de acceso de secuencia de referencia	Primer Forward	Primer Reverse
Sirt1	XM_864818.2	ATACACTGGAGCAGGTT 1031-1047	TTCATCAGCTGGGCATCTAG 1175-1194
Sirt3	XM_873980.3	GCTAGGTTCCCTGCTGCATCT 746-765	GATGAGGTCCTGGATGTCGT 990-1009

Después de obtener los productos de PCR con estos oligonucleótidos, se calcularon el número de copias para cada sirtuína:

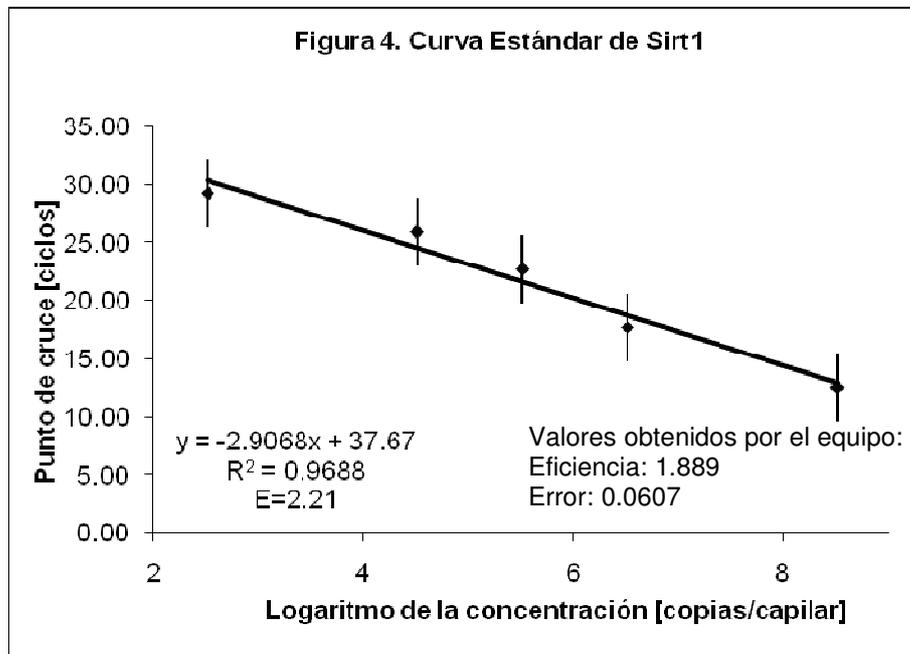
$$\text{Copias Sirt1}/\mu\text{L} = \frac{(582.9 \text{ ng}/\mu\text{L})(1 \times 10^{-9})}{106916 \text{ Da}} * 6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas} = 3.284 \times 10^{12}$$

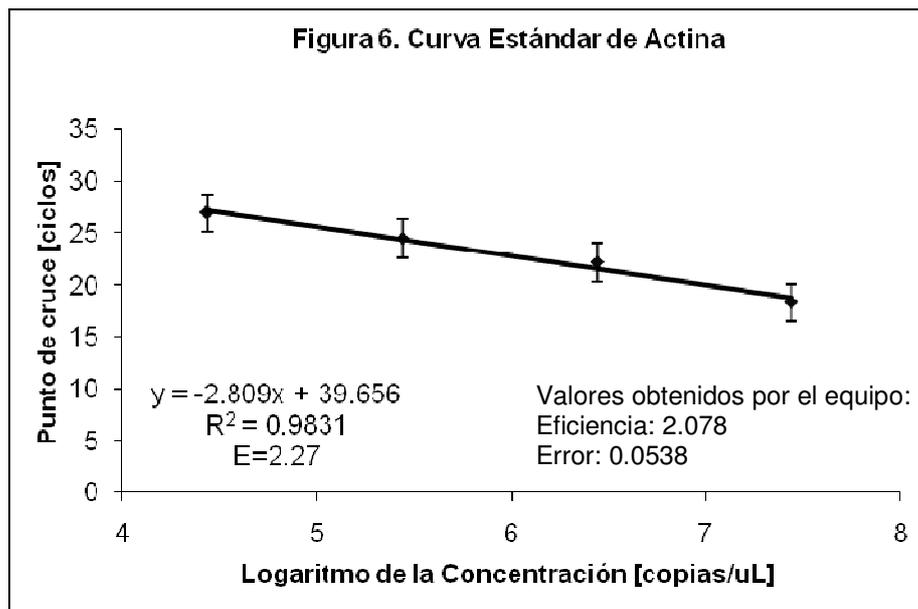
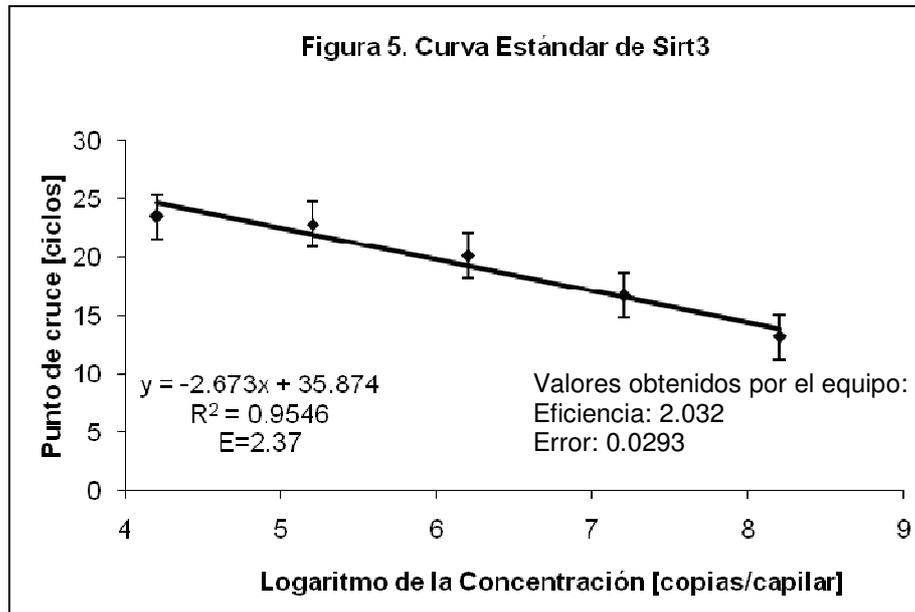
$$\text{Copias Sirt3}/\mu\text{L} = \frac{(433.1 \text{ ng}/\mu\text{L})(1 \times 10^{-9})}{163193 \text{ Da}} * 6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas} = 1.599 \times 10^{12}$$

A partir de estos productos de PCR se prepararon diluciones seriadas para obtener las siguientes concentraciones: 3.28×10^8 , 3.28×10^7 , 3.28×10^6 , 3.28×10^5 , 3.28×10^4 y 3.28×10^2 para Sirt1 y 1.60×10^8 , 1.60×10^7 , 1.60×10^6 , 1.60×10^5 , 1.60×10^4 y 1.60×10^2 para Sirt3.

En el caso de β -Actina, el gen de referencia empleado, también se obtuvo un producto de PCR, cuyo número de copias por microlitro fue de 2.75×10^{12} . Se obtuvieron las mismas diluciones que para las sirtuínas.

Las curvas obtenidas se muestran a continuación:





Las eficiencias se obtuvieron mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{Pendiente})}$$

Después de haber obtenido las curvas, se procedió a hacer el análisis de las muestras. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 8.

Cuadro 5. Efecto del tipo de sirtuina y tejido sobre la media de su expresión relativa (mRNA).

Sirtuina	Tejido	Edad	Expresión Relativa	Error Estándar	Valor de P
Sirt1	Hígado	Neonato	3.53	0.52	0.0530
		Adulto	5.05	0.52	
	Músculo	Neonato	3.05	0.20	<.0001
		Adulto	0.45	0.20	
	Tejido Adiposo	Neonato	1.99	0.31	0.3154
		Adulto	2.46	0.33	
Sirt3	Hígado	Neonato	4.15	5.55	0.0068
		Adulto	27.58	5.55	
	Músculo	Neonato	3.29	0.44	<.0001
		Adulto	6.83	0.44	
	Tejido Adiposo	Neonato	3.51	0.96	0.0346
		Adulto	6.73	1.05	

Hígado: Se presenta la mayor expresión de Sirt3 en los animales adultos (P=0.0001).

Músculo: Existen diferencias significativas en la expresión de Sirt1 y Sirt3 en adultos (P<0.0001), siendo mayor la de Sirt3.

Tejido Adiposo: Sirt3 tiene una mayor expresión en animales adultos (P=0.0003).

9. Discusión

9.1. Experimento 1: Clonar y secuenciar Sirt1, Sirt2, Sirt3, Sirt4, Sirt5, Sirt6 y Sirt7 de la especie bovina.

Los fragmentos de las secuencias obtenidas correspondientes a las sirtuínas bovinas tienen una homología del 96 al 100% con las secuencias predichas/reportadas para *Bos taurus* en el GenBank (NCBI). Al comparar la homología de las sirtuínas bovinas con las sirtuínas de otras especies, se observa una homología con *Homo sapiens* (75-94% de identidad), *Mus musculus* (78-91% de identidad), *Sus scrofa* (82-96% de identidad), y *Equus caballus* (75-95% de identidad). Adicionalmente, Sirt2 y Sirt5 presentan una homología con *Rattus norvegicus* de 85 y 83% de identidad, respectivamente, y Sirt4 presenta una homología con *Ovis aries* del 96%.

Frye (1999) obtuvo las secuencias de las sirtuínas humanas Sirt1 a Sirt5 (Nos. de acceso GenBank AF083106-AF083110). El tejido empleado para la obtención de las secuencias fue el testículo, igual que en este proyecto para Sirt1, Sirt2 y Sirt4. Al comparar las secuencias obtenidas en este trabajo con las obtenidas por Frye, se observan las siguientes homologías Sirt1 94% de identidad; Sirt2 87% de identidad; Sirt3 y Sirt5 84% de identidad; Sirt4, Sirt6 y Sirt7 no presentan homología.

Al comparar las secuencias de las sirtuínas de *Bos taurus* con *Saccharomyces cerevisiae* y *Drosophila melanogaster*, se encuentra que no hay homología entre ellas.

9.2. Experimento 2: Medir la expresión de Sirt1 y Sirt3 en hígado, músculo y tejido adiposo blanco de bovino adulto y neonato mediante PCR en tiempo real.

Los resultados obtenidos muestran que Sirt1 tiene una mayor expresión ($P=0.0530$) en hígado de adulto y ($P<0.0001$) en músculo de neonato, teniendo una expresión estadísticamente igual ($P=0.3154$) en tejido adiposo blanco. Sin embargo, la expresión de Sirt3 en los tres tejidos es mayor ($P<0.05$) en adulto, siendo la mayor en hígado.

En 1999, Frye caracterizó la expresión de las sirtuínas humanas Sirt1-Sirt5 en diferentes tejidos de adulto y feto, pudiéndose observar que la presencia de Sirt3 es mayor en hígado y músculo de adulto, comparado con Sirt1; mientras que en feto, la expresión de ambas sirtuínas parece ser similar. Al comparar la expresión entre adultos y fetos, se puede observar que en Sirt1 la expresión es mayor en los fetos y que en el caso de Sirt3 parece ser igual o similar en hígado pero en músculo parece ser mayor en los fetos.

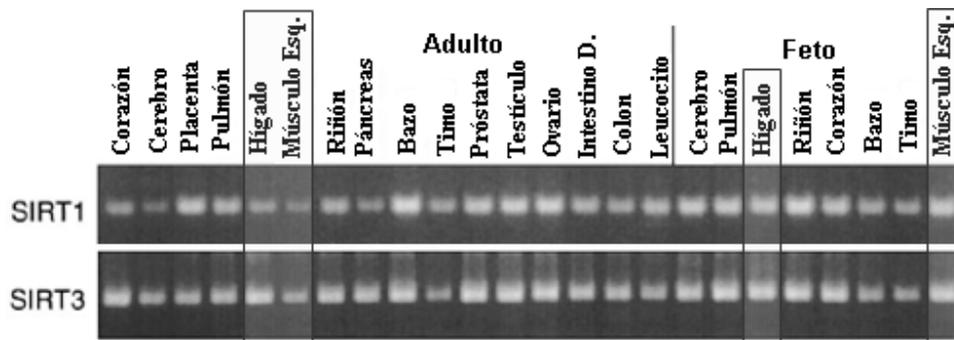


Figura 7. Expresión de los genes de las sirtuínas humanas en tejidos de adultos y fetos normales (adaptado de Frye, 1999).

De acuerdo a esta información, los resultados obtenidos concuerdan con la mayor expresión de Sirt1 en músculo de neonato con respecto al adulto, la mayor expresión de Sirt3 en hígado de adulto con respecto a Sirt1, expresión similar de ambas sirtuínas en músculo de neonato, y mayor expresión de Sirt3 en músculo de adulto con respecto a Sirt1. En contraste, se tiene que en el caso de los fetos parece haber mayor expresión en los resultados de Frye, mientras que en este trabajo en los neonatos se presentan diferencias en los patrones de expresión.

Shan *et al.* (2009) estudiaron el patrón de expresión de Sirt1 en cerdos, analizando diferentes tejidos. De este estudio encontraron que Sirt1 tiene la mayor expresión en cerebro, siendo menor en bazo y tejido adiposo blanco, mientras que en hígado es baja pero detectable. Asimismo, observaron que en tejido adiposo subcutáneo y omental, la expresión del mRNA de Sirt1 es mayor en cerdos adultos que en cerdos jóvenes ($P < 0.01$).

Estos resultados no concuerdan con lo encontrado para bovinos, ya que en el presente estudio se encontró que la expresión de esta sirtuína en tejido adiposo subcutáneo es estadísticamente igual para adultos y neonatos ($P = 0.3154$) y que en hígado es mayor que en tejido adiposo blanco.

De acuerdo a numerosos estudios, se ha demostrado que la expresión de Sirt1 es inducida bajo condiciones de restricción calórica o de ayuno de hasta 24 horas, principalmente en cerebro, hígado, músculo, riñón y tejido adiposo, en roedores (Dilova *et al.*, 2007). Por lo tanto, la baja expresión de Sirt1 en adultos, comparada con la de Sirt3, se puede explicar por el tipo de animales empleados en el muestreo, ya que estos animales se encontraban en edad de sacrificio y fueron engordados por productores de carne, por lo que la probabilidad de que hayan sido sometidos a restricción calórica es muy baja y, por tanto, los valores de expresión de Sirt1 obtenidos podrían corresponder a los niveles de expresión normales, es decir, bajo condiciones de alimentación con las que se cubren satisfactoriamente todos los requerimientos de mantenimiento, e incluso los de producción.

A pesar de esto, estos resultados son diferentes a los obtenidos por Afshar y Murnane (1999) en la expresión de SIR2L, homólogo en humanos de Sir2p y del cual Sirt1 es el más parecido, ya que ellos encontraron que la expresión de este gen es mayor en corazón, cerebro y músculo esquelético.

En el caso del músculo, la expresión de Sirt1 se incrementa, al igual que en el hígado, cuando hay restricción calórica, y los niveles de proteína se reducen cuando hay un exceso de nutrientes (Yu y Auwerx, 2009). Por tanto, los altos niveles de Sirt1 encontrados en músculo de los bovinos neonatos se pueden

explicar por el hecho de que estos animales provenían de ranchos productores de leche, por lo que los becerros no tenían libre acceso a la leche de la madre, provocándoles un tipo de restricción calórica.

Fulco *et al.* (2003) encontraron que la proteína Sirt1 se expresa en los mioblastos y disminuye sus niveles a lo largo del proceso de diferenciación, pudiendo esto explicar los bajos niveles de expresión encontrados en los adultos.

A pesar de todos los datos que apoyan el hecho de que la restricción calórica incrementa los niveles de expresión de Sirt1 en todos los tejidos en general, Chen *et al.* (2008) encontraron, al comparar la expresión de Sirt1 en hígado, músculo y tejido adiposo blanco de ratones alimentados *ad libitum* y bajo restricción calórica, que la expresión en hígado de los ratones con restricción calórica disminuyó, mientras que en músculo y tejido adiposo aumentó.



Figura 8. Expresión de Sirt1 en ratones alimentados *ad libitum* (AL) o bajo restricción calórica (CR) (Chen *et al.*, 2008).

De acuerdo a estos resultados (Fig. 7), los niveles de expresión de Sirt1 normales son mayores en tejido adiposo, seguido por hígado y con los niveles más bajos en músculo. Esto no concuerda con lo obtenido para tejido adiposo, ya que en este estudio encontramos mayor expresión en hígado, mientras que en músculo sí coincide la menor expresión.

En 2002, Onyango *et al.* determinaron, mediante Northern blots, los patrones de expresión de Sirt3 en diferentes tejidos de humano, encontrando que en adultos se encuentra altamente expresado en corazón, músculo esquelético, riñón e hígado, y en menor proporción en placenta y pulmón, y en fetos en riñón e hígado más que en pulmón y cerebro. Esta información concuerda con los resultados obtenidos.

Sirt3 presenta niveles bajos de expresión en músculo de animales diabéticos y en tejido adiposo marrón de ratones obesos. Bajo condiciones de restricción calórica, la expresión de Sirt3 incrementa en ambos tejidos adiposos (Shi *et al.*, 2005).

Sirt1 presenta altos niveles de expresión en cerebro, testículo, músculo esquelético, riñón, glándula tiroides y útero, mientras que en hígado, bazo, corazón, pulmón, ovarios y médula ósea tiene bajos niveles de expresión. Sirt3 tiene una elevada expresión en ovarios y, en general, en la mayoría de los tejidos tiene alta expresión (Dali-Youcef *et al.*, 2007), con lo cual se explica la diferencia en los niveles de expresión entre ambas sirtuínas (Sirt3 > Sirt1 en los tres tejidos).

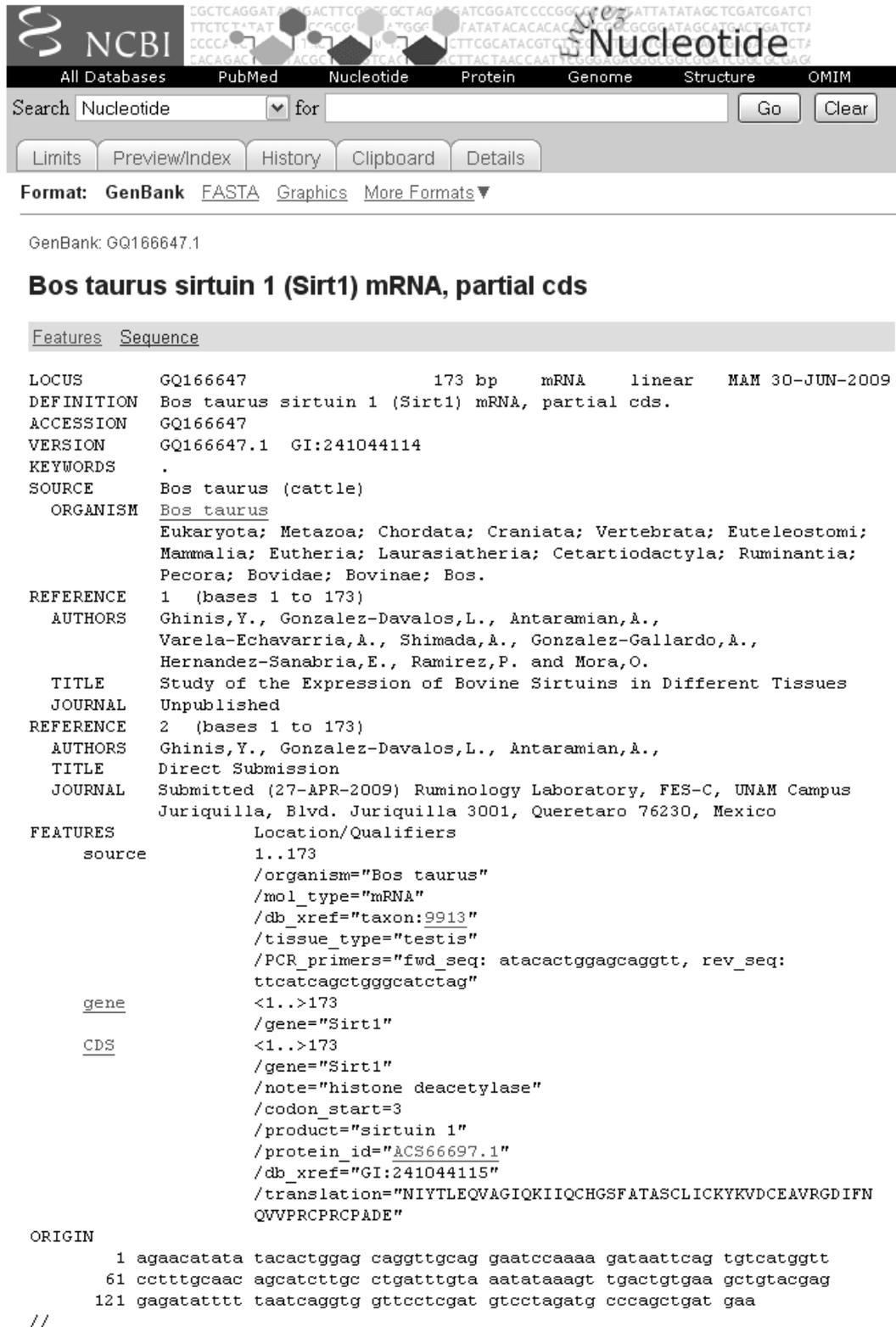
10. Conclusiones

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir que, a pesar de la alta homología existente entre las sirtuínas de bovino y las de otras especies de mamíferos, los patrones de expresión son distintos. Además, estos patrones de expresión se modifican con la edad del bovino.

Los resultados obtenidos concuerdan con algunos trabajos existentes sobre la expresión de las sirtuínas en diferentes especies, principalmente ratones y humanos. Sin embargo, se requieren más datos de los patrones de expresión de las sirtuínas bovinas y en los que, además, se analice la relación de éstas con las diversas funciones celulares en las que participan y bajo diferentes esquemas metabólicos.

Del presente estudio se puede partir para estudiar las sirtuínas de bovino más detalladamente, permitiendo comprender mejor la relación entre estas proteínas y el metabolismo en esta especie.

11. Anexos



NCBI Nucleotide

All Databases PubMed Nucleotide Protein Genome Structure OMIM

Search Nucleotide for Go Clear

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Format: GenBank FASTA Graphics More Formats ▼

GenBank: GQ166647.1

Bos taurus sirtuin 1 (Sirt1) mRNA, partial cds

Features Sequence

LOCUS GQ166647 173 bp mRNA linear MAM 30-JUN-2009

DEFINITION Bos taurus sirtuin 1 (Sirt1) mRNA, partial cds.

ACCESSION GQ166647

VERSION GQ166647.1 GI:241044114

KEYWORDS .

SOURCE Bos taurus (cattle)

ORGANISM Bos taurus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovidae; Bovinae; Bos.

REFERENCE 1 (bases 1 to 173)

AUTHORS Ghinis, Y., Gonzalez-Davalos, L., Antaramian, A., Varela-Echavarria, A., Shimada, A., Gonzalez-Gallardo, A., Hernandez-Sanabria, E., Ramirez, P. and Mora, O.

TITLE Study of the Expression of Bovine Sirtuins in Different Tissues

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 173)

AUTHORS Ghinis, Y., Gonzalez-Davalos, L., Antaramian, A.,

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (27-APR-2009) Ruminology Laboratory, FES-C, UNAM Campus Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, Queretaro 76230, Mexico

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..173
/organism="Bos taurus"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:9913"
/tissue_type="testis"
/PCR_primers="fwd_seq: atacactggagcaggtt, rev_seq: ttcacacagctgggcatctag"

gene <1..173
/gene="Sirt1"

CDS <1..173
/gene="Sirt1"
/note="histone deacetylase"
/codon_start=3
/product="sirtuin 1"
/protein_id="ACS66697.1"
/db_xref="GI:241044115"
/translation="NIYTLEQVAGIQKIIQCHGSFATASCLICKYKVDCEAVRGDIFN QVVPRCPRCPADE"

ORIGIN

1 agaacatata tacactggag caggttgcag gaatccaaaa gataattcag tgtcatgggt
61 cctttgcaac agcatcttgc ctgatttgta aatataaagt tgactgtgaa gctgtacgag
121 gagatatttt taatcaggtg gttcctcgat gtcctagatg cccagctgat gaa

//

NCBI Nucleotide search interface. Search criteria: Nucleotide for []. Navigation buttons: Limits, Preview/Index, History, Clipboard, Details. Format options: GenBank, FASTA, Graphics, More Formats.

GenBank: GQ166648.1

Bos taurus sirtuin 2 (Sirt2) mRNA, partial cds

Features Sequence

LOCUS GQ166648 648 bp mRNA linear MAM 30-JUN-2009
 DEFINITION Bos taurus sirtuin 2 (Sirt2) mRNA, partial cds.
 ACCESSION GQ166648
 VERSION GQ166648.1 GI:241044129
 KEYWORDS .
 SOURCE Bos taurus (cattle)
 ORGANISM Bos taurus

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovidae; Bovinae; Bos.

REFERENCE 1 (bases 1 to 648)
 AUTHORS Ghinis, Y., Gonzalez-Davalos, L., Antaramian, A., Varela-Echavarria, A., Shimada, A., Gonzalez-Gallardo, A., Hernandez-Sanabria, E., Ramirez, P. and Mora, O.
 TITLE Study of the Expression of Bovine Sirtuins in Different Tissues
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 648)
 AUTHORS Gonzalez-Davalos, L., Gonzalez-Gallardo, A., Hernandez-Sanabria, E., Antaramian, A., Varela-Echavarria, A., Shimada, A. and Mora, O.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (27-APR-2009) Ruminology Laboratory, FES-C, UNAM Campus Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, Queretaro 76230, Mexico

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..648
 /organism="Bos taurus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9913"
 /tissue_type="testis"
 /PCR_primers="fwd_seq: gagaagatcttctccga, rev_seq: ctccttgggtgggaggtg"
 gene <1..648
 /gene="Sirt2"
 CDS <1..543
 /gene="Sirt2"
 /note="histone deacetylase"
 /codon_start=1
 /product="sirtuin 2"
 /protein_id="ACS66698.1"
 /db_xref="GI:241044130"
 /translation="EKIFSEVTPKCEKQSVVVKPDIVFFGENLPARFFSCHQSDFLKV
 DLLIIMGTSLQVQPFASLIGKAPLSTPRLLINKEKTGQTFPLGMMMALGGGMDPDSK
 KAYRDVAVLGDGCDQGCLALADLLGWKKELEDLVRKEHASIDAQSGSGASNPATSASPR
 NSPPPTKEEPRTTEGEKPKQ"

ORIGIN
 1 gagaagatct tctccgaggt gactcccaag tgtgagaaat gtcagagcgt ggtgaagcct
 61 gatatcgtgt tcttcgggga gaacctccca ggcggtttct tctcctgcat gcagtcagac
 121 ttccctaaagg tggacctcct tatcatcatg ggcacctccc tgcaggtgca gcccttcgcg
 181 tccctcatcg gcaaggcgcc cctgtcgacc ccgcgccctgc tcatcaacaa ggagaagact
 241 ggccagactg accctttcct cgggatgatg atggccctcg gaggaggcat ggactttgac
 301 tccaagaagg cctacaggga cgtggcctgg ctgggcgact gtgaccaggg ctgcctggcc
 361 ctgcgccgacc tccttggatg gaagaaggag ctggaggacc ttgttcggaa ggagcatgcc
 421 agcatagatg cccagtcggg gtcggggggcc tctaaccctg ctacttcagc ttccccagg
 481 aattctccac cacctccccc caaggaggag cccaggacca ctgagggaga gaacccccag
 541 tgaccactgc gtctcccagg caggacaccc agccttggga cagctgagcc ccaaccagcc
 601 ctggccctcc tctaacttac agctcttttc tggggagctc agaacatt

//


CGCTCAGGAT...GACTTCG...CGCTAG...GATCGGATCCCGGC...GATTATATAGCTCGATCGATCT
TTCTCTATAT...TTCGG...ATGGG...FATATACACACAG...TCCGGATAGCATC...ACTGATCTA
CCCCA...T...CTTCGCATACGT...CTTACTAATCAAT...T...GAG

Nucleotide

[All Databases](#)
[PubMed](#)
[Nucleotide](#)
[Protein](#)
[Genome](#)
[Structure](#)
[OMIM](#)

Search for

Format: [GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [More Formats](#)

GenBank: GQ166649.1

Bos taurus sirtuin 3 (Sirt3) mRNA, partial cds

[Features](#)
[Sequence](#)

LOCUS GQ166649 616 bp mRNA linear MAM 30-JUN-2009
DEFINITION Bos taurus sirtuin 3 (Sirt3) mRNA, partial cds.
ACCESSION GQ166649
VERSION GQ166649.1 GI:241044133
KEYWORDS .
SOURCE Bos taurus (cattle)
ORGANISM Bos taurus
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;
 Pecora; Bovidae; Bovinae; Bos.
REFERENCE 1 (bases 1 to 616)
AUTHORS Ghinis, Y., Gonzalez-Davalos, L., Antaramian, A.,
 Varela-Echavarria, A., Shimada, A., Gonzalez-Gallardo, A.,
 Hernandez-Sanabria, E., Ramirez, P. and Mora, O.
TITLE Study of the Expression of Bovine Sirtuins in Different Tissues
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 616)
AUTHORS Gonzalez-Davalos, L., Antaramian, A., Varela-Echavarria, A.,
 Shimada, A. and Mora, O.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (27-APR-2009) Ruminology Laboratory, FES-C, UNAM Campus
 Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, Queretaro 76230, Mexico
FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..616
 /organism="Bos taurus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9913"
 /tissue_type="kidney"
 /PCR_primers="fwd_seq: aagcatggcggttgtttcctc, rev_seq:
 aaacgtgccccgagctcttc"
 gene <1..>616
 /gene="Sirt3"
 CDS <1..>616
 /gene="Sirt3"
 /note="histone deacetylase"
 /codon_start=2
 /product="sirtuin 3"
 /protein_id="ACS66699.1"
 /db_xref="GI:241044134"
 /translation="SKAVVSLVSDCSNPLRFNGLRGARAWTRWPRIPGGGWSISCFAG
 ASSDTGGGDHSQKFLLDIAELIKTRACQKVVVMVAGISTPSGIPDFRSPGVGYYS
 ILQYKLPYPEAIFELSFHDPKPFITFAKKLYPGNYRPNATHYFLRLLHEKGLLLR
 LYTQNIIDGLERASGIPDSKLVEAHGSLASATCTVCRPPYPGEDFW"
ORIGIN
 1 aagcaaggcc gtggtttccc tcgtttcaga ctgttccaac ccctcaggt tctggggcct
 61 gcgaggtgcg cgggcgtgga cccgctggcc tcgtattcca ggtggaggat ggtccatc
 121 ttgttttgcg ggtgcctcaa gtgacactgg agggggagac cacagtcaga agaagtttct
 181 cctgcaggac atcgtgagc tgattaagac cagagcctgc cagaaggtgg tggctatggt
 241 gggggccggc atcagcacac ccagcggcat cccagacttc aggtctccgg gggttggcta
 301 ctacagcatc ctccagcagt acaagctccc ctaccctgag gccatttttg agctctcctt
 361 tttctttcat gaccccaagc catttttcac ttttgccaag aagctgtacc ctgggaacta
 421 taggcccact gctactcact acttctctcg attgctacac gagaaggggc tgcttctgcy
 481 gctctacacc cagaacatcg acgggctcga gagagcatct ggcacccctg actcaaagct
 541 cgttgaagct catggatccc ttgcctctgc cacctgcacc gtctgccgaa gaccctaccc
 601 aggggaggac ttctgg
 //

GenBank: GQ166650.1

Bos taurus sirtuin 4 (Sirt4) mRNA, partial cds

[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS GQ166650 594 bp mRNA linear MAM 30-JUN-2009

DEFINITION Bos taurus sirtuin 4 (Sirt4) mRNA, partial cds.

ACCESSION GQ166650

VERSION GQ166650.1 GI:241044141

KEYWORDS .

SOURCE Bos taurus (cattle)

ORGANISM [Bos taurus](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovidae; Bovinae; Bos.

REFERENCE 1 (bases 1 to 594)

AUTHORS Ghinis,Y., Gonzalez-Davalos,L., Antaramian,A., Varela-Echavarria,A., Shimada,A., Gonzalez-Gallardo,A., Hernandez-Sanabria,E., Ramirez,P. and Mora,O.

TITLE Study of the Expression of Bovine Sirtuins in Different Tissues
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 594)

AUTHORS Gonzalez-Gallardo,A., Gonzalez-Davalos,L., Ramirez,P., Antaramian,A., Varela-Echavarria,A., Shimada,A. and Mora,O.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (27-APR-2009) Ruminology Laboratory, FES-C, UNAM Campus Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, Queretaro 76230, Mexico

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..594
 /organism="Bos taurus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9913"
 /tissue_type="testis"
 /PCR_primers="fwd_seq: aagtgtcccttaagctgtgg, rev_seq: agagatggtgctttgccgcc"
 gene <1..594
 /gene="Sirt4"
 CDS <1..450
 /gene="Sirt4"
 /note="histone deacetylase"
 /codon_start=1
 /product="sirtuin 4"
 /protein_id="ACS66700.1"
 /db_xref="GI:241044142"
 /translation="RVLCCLDCGEQTPRGVLQERFQVLNPTWSAEAHGLAPDGDVFLTE
 EEVQSFQVPSCSRCCGGPLKPDVVFVFGDITVKPKVDFVHKRVKLEADSLLVGGSSLQVYS
 GYRFILTAREKKLPVILNIGPTRSDDLASLKLDSRCGELLPLIDPR"

ORIGIN

```

1 agggctctct gcttggattg tggggagcag actccccgtg ggggtctgca ggagcggttc
61 caagtcctga acccaacctg gagtgccgag gcccacggcc tggctccccg cgcgatgtc
121 tttctcaccg aggaggaggt acagagcttc cagggtcccat cctgctctcg atgtgggggc
181 ccctgaaac cagacgtcgt cttcttcggg gacacggtga agcctgacaa ggttgatttt
241 gtgcacaaga ggggtgaaaga agctgactcc ctcttggtgg tgggatcatc cttgcaggtg
301 tactcaggtt acaggttcat cctcactgcc cgagagaaga agctgccccat cgtgatactg
361 aacattgggc ccacgcggtc cgatgacctg gcatctctga aactggattc tcgttggtga
421 gagttgctgc cattaataga cccacgctga ccacagcctg atgttctgga gccggaaact
481 ggggctttca cttaattct gctgctaagg atacctaagg attcatcccc gcttctctca
541 tctgaccgag gcttaccacac tgtagcctgc agagggcggc aaagcaacat ctct

```

//

NCBI Nucleotide

All Databases PubMed Nucleotide Protein Genome Structure OMIM

Search Nucleotide for [] Go Clear

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Format: GenBank FASTA Graphics More Formats

GenBank: GQ166651.1

Bos taurus sirtuin 5 (Sirt5) mRNA, complete cds

Features Sequence

LOCUS GQ166651 1094 bp mRNA linear MAM 30-JUN-2009
 DEFINITION Bos taurus sirtuin 5 (Sirt5) mRNA, complete cds.
 ACCESSION GQ166651
 VERSION GQ166651.1 GI:241044148
 KEYWORDS .
 SOURCE Bos taurus (cattle)
 ORGANISM Bos taurus
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;
 Pecora; Bovidae; Bovinae; Bos.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1094)
 AUTHORS Ghinis, Y., Gonzalez-Davalos, L., Antaramian, A.,
 Varela-Echavarría, A., Shimada, A., Gonzalez-Gallardo, A.,
 Hernandez-Sanabria, E., Ramirez, P. and Mora, O.
 TITLE Study of the Expression of Bovine Sirtuins in Different Tissues
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1094)
 AUTHORS Gonzalez-Davalos, L., Ghinis, Y., Antaramian, A.,
 Varela-Echavarría, A., Shimada, A. and Mora, O.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (27-APR-2009) Ruminology Laboratory, FES-C, UNAM Campus
 Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, Queretaro 76230, Mexico

FEATURES
 source 1..1094
 /organism="Bos taurus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9913"
 /tissue_type="kidney"
 /PCR_primers="fwd_seq: tggggagaggaatgcaacac, rev_seq:
 ttggattccagcccagcaat"
 gene 1..1094
 /gene="Sirt5"
 CDS 31..963
 /gene="Sirt5"
 /note="histone deacetylase"
 /codon_start=1
 /product="sirtuin 5"
 /protein_id="ACS66701.1"
 /db_xref="GI:241044149"
 /translation="MPPLWII RNRLFSKLYCGLKSPVSTQTKICTLMARPSSNMADFR
 KCFAKAKHIVVISGAGISAESGVPTFRGAGGYWRKWKQAQLATPQAFARNPSQVWEFY
 HYRREVVQSTEPNAGHLAIAEQARLHRQGRQVVVITQNIIDELHRKAGTKNLLIEHGS
 LFKTRCTSCGVVAENYKSPICPALSGKGAPDPQTQDAGIPVEKLRCEEAGCGGLLRP
 HVVWFGENLDPAILLEVDKELALCDLCLVVGTSVVYPAAMFAPQVSARGVPVAEFNM
 ETPATERFRFHFQGPCGTTLPEALAPHETETVS"

ORIGIN
 1 tggggagagg aatgcaacac agaaaacctg atgccacctc tctggatcat ccggaaccga
 61 ttgttttcca agctgtatg tggactgaag tctccagtct ccacacaaac caagatttgc
 121 ctaacaatgg ctctgtccaag ttcaaatatg gctgacttcc ggaagtgttt tgcaaaaagcc
 181 aagcacatag tcgtcatttc cggggctggc atcagtgctg agagtggggt tccaacgttc
 241 agaggagcag gaggttactg gagaaaatgg aaagcccagg acctggccac cccgagggcc
 301 ttcgcccgga acccgtcca ggtgtgggag ttctaccact accggcggga ggtggtgcag
 361 agcacggagc ccaacgcccg gcacctggcc atcgccgagt gccaggcccc gctgcacagg
 421 cagggccgac aggtggtggt catcaccag aacatcgacg agctgcaccg caaggctggc
 481 accaagaacc ttctggaat ccatggtagc ttatttaaaa ctctgatgac ctcttgtgga
 541 gttgtggctg agaactataa gagtccaatt tgtccagcct taccaggaaa aggggctcca
 601 gacccccaaa ctcaagatgc cggaaatcca gtggagaaac tgccccggtg tgaagaggca
 661 ggatgtgggg gcctgctgag acctcacgtg gtgtggtttg gagaaaacct ggaccctgcc
 721 atcctggagg aggtggacaa agagctggcc ctctgtgacc tgtgtctagt ggtgggact
 781 tcctccgtgg tctatcccgc gccatgttt gcccccagg tgtcagcccg cggcgtgcca
 841 gtggccgaat tcaacatgga aaccaccccg gccaccgaa gattcaggtt tcatttccag
 901 gggccgtgtg ggacgactct tcctgaagcc ctgcctctc acgaaactga aactgtttca
 961 tagccatcct ggggaaggaa gaaatctcag cgcattcaag taccagacca ccagcgggaa
 1021 ggcagtcttg tggatggtga gccaaatact ggaaagtctg aaaatatctt ttgattgctg
 1081 ggctggaatc caaa

//

NCBI Nucleotide

All Databases PubMed Nucleotide Protein Genome Structure OMIM

Search Nucleotide for [] Go Clear

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Format: GenBank FASTA Graphics More Formats

GenBank: GQ166652.1

Bos taurus sirtuin 6 (Sirt6) mRNA, 3' UTR

[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS GQ166652 231 bp mRNA linear MAM 30-JUN-2009

DEFINITION Bos taurus sirtuin 6 (Sirt6) mRNA, 3' UTR.

ACCESSION GQ166652

VERSION GQ166652.1 GI:241044152

KEYWORDS .

SOURCE Bos taurus (cattle)

ORGANISM Bos taurus
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovidae; Bovinae; Bos.

REFERENCE 1 (bases 1 to 231)
 AUTHORS Ghinis,Y., Gonzalez-Davalos,L., Antaramian,A., Varela-Echavarria,A., Shimada,A., Gonzalez-Gallardo,A., Hernandez-Sanabria,E., Ramirez,P. and Mora,O.
 TITLE Study of the Expression of Bovine Sirtuins in Different Tissues
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 231)
 AUTHORS Ghinis,Y., Gonzalez-Davalos,L., Antaramian,A., Varela-Echavarria,A., Shimada,A. and Mora,O.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (27-APR-2009) Ruminology Laboratory, FES-C, UNAM Campus Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, Queretaro 76230, Mexico

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..231
 /organism="Bos taurus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9913"
 /tissue_type="kidney"
 /PCR_primers="fwd_seq: ttaacttggggcctatggag, rev_seq: ttaggctggaaatcagggag"

gene <1..>231
 /gene="Sirt6"
 /note="sirtuin 6"

3' UTR <1..>231
 /gene="Sirt6"

ORIGIN

```

1 ttttaacttgg ggcctatgg agggggcttg gcaaggagca tcctgcccc ggatcctgaa
61 cttggagctg acaaccccac acctgctcca cccccagtct gcagcccctg actcagggtg
121 ttcttgggag gctgaccag gccctccctg atttcagcc taacagggaa tcccgcctgt
181 ctgccccctg gaccctcaaa ctcccaaac tctgcctaata cccccacaca g
//
    
```


12. Referencias Bibliográficas

Afshar G & JP Murnane. 1999. Characterization of a human gene with sequence homology to *Saccharomyces cerevisiae* SIR2. *Gene* 234: 161-168.

Argmann C & J Auwerx. 2006. Insulin Secretion: Sirt4 Gets in on the Act. *Cell* 126: 837-839.

Bordone L & L Guarente. 2005. Calorie restriction, Sirt1 and metabolism: Understanding longevity. *Nature Rev* 6: 298-305.

Chen D, J Bruno, E Easlson, S-J Lin, H-L Cheng, FW Alt & L Guarente. 2008. Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes Dev* 22 (13): 1753-1757.

Cohen H, C Miller, KJ Bitterman, *et al.* 2004. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305: 390-392.

Dali-Youcef N, M Lagouge, S Froelich, C Koehl, K Schoonjans & J Auwerx. 2007. Sirtuins: The 'magnificent seven', function, metabolism and longevity. *Ann Med* 39 (5): 335-345.

Dilova I, E Easlson & S-J Lin. 2007. Calorie restriction and the nutrient sensing signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 64: 752-767.

Emery R. 1979. Mobilization, turnover and disposition of adipose tissue lipids. In: *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants. Proceedings of the 5th International Symposium on Ruminant Physiology. France.*

Frescas D, L Valenti & D Accili. 2005. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via sirt-dependent deacetylation promotes expression of gluconeogenic genes. *J Biol Chem* 280: 20589-20595.

Frye R. 2000. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Comm* 273: 793-798.

Frye R. 1999. Characterization of Five Human cDNAs with Homology to the Yeast SIR2 Gene: Sir2-like Proteins (Sirtuins) Metabolize NAD and May Have Protein ADP-Ribosyltransferase Activity. *Biochem Biophys Res Comm* 260: 273-279.

Fulco M, RL Schlitz, S Iezzi, *et al.* 2003. Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell* 12: 51-62.

Grudsky PR & JL Arias. 1983. Aspectos generales de la microbiología del rumen. *Monografías de Medicina Veterinaria* 5 (2).

- Han E-S & M Hickey. 2005. Microarray Evaluation of Dietary Restriction. *J Nutr* 135: 1343-1346.
- Huntington G. 1999. Nutrient Metabolism by Gastrointestinal Tissues of Herbivores. In: *Nutritional Ecology of Herbivores*. HJG Jung and GC Fahey Jr. American Society of Animal Science. Illinois, USA.
- Lombard DB, FW Alt, HL Cheng, *et al.* 2007. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol* 27: 8807–8814.
- Martínez-Conde A. & P Mayor. Calculador de Peso Molecular de DNA. Sitio Web del Laboratorio 314 del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. <http://www.lab314.com/genmol/dsdna.htm>.
- Nakagawa T, DJ Lomb, MC Haigis & L Guarente. 2009. Sirt5 Deacetylates Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 and Regulates the Urea Cycle. *Cell* 137: 560-570.
- North BJ & DA Sinclair. 2007. Sirtuins: a conserved key unlocking AceCS Activity. *Trends Biochem Sci.* 32 (1): 1-4.
- North BJ & E Verdin. 2004. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biology* 5: 224.1-224.12.
- Onyango P, I Celic, JM McCaffery, JD Boeke & AP Feinberg. 2002. SIRT3, a human SIR2 homologue, is a NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *PNAS* 99 (21): 13653-13658.
- Picard F, M Kurtev, N Chung, *et al.* 2004. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR γ . *Nature* 429: 771-776.
- Puigserver P, J Rhee, J Donovan, *et al.* 2003. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature* 423: 550-555.
- Rodgers JT & P Puigserver. 2006. Certainly can't live without this: Sirt6 (Previews). *Cell Metab.* 3 (2): 77-78.
- Rodgers JT, C Lerin, W Haas, *et al.* 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* 434: 113- 118.
- Ruíz A, M Sagarnaga, JM Salas, *et al.* 2004. Impacto del TLCAN en la cadena de valor de bovinos para carne. Universidad Autónoma de Chapingo.
- SAGARPA. 2009. Escenario Base 2009-2018 Proyecciones para el Sector Agropecuario de México.
- SAGARPA. 2009. Escenario Base 2009-2018 Resumen Ejecutivo.

- Sakamoto J, T Miura, K Shimamoto & Y Horio. 2004. Predominant expression of Sir2 α , an NAD-dependent histone deacetylase, in the embryonic mouse heart and brain. *FEBS Letters* 556 (3): 281-286.
- Saunders LR & E Verdin. 2007. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene* 26: 5489-5504.
- Schwer B, BJ North, R Frye, M Ott & E Verdin. 2002. The human silent information regulator (Sir) 2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol* 158 (4): 647-657.
- Shan T, Y Wang, T Wu, C Liu, J Guo, Y Zhang, J Liu & Z Xu. 2009. Porcine sirtuin 1 gene clone, expression pattern, and regulation by resveratrol. *J Anim Sci* 87: 895-904.
- Shay N & W Banz. 2005. Regulation of gene transcription by botanicals: novel regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr* 25: 297-315.
- Shi T, F Wang, E Stieren & Q Tong. 2005. SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem* 280: 13560-13567.
- Shimada A. 2003. *Nutrición animal*. Ed. Trillas. México, D.F.
- Shoba B, ZM Lwin, LS Ling, B-H Bay, GW Yip & SD Kumar. 2009. Function of Sirtuins in Biological Tissues. *Anat Rec* 292: 536-543.
- Sterner D & S Berger. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 64: 435-459
- Walford RL, SB Harris, & R Weindruch. 1987. Dietary Restriction and Aging: Historical Phases, Mechanisms and Current Directions. *J. Nutr.* 117: 1650-1654.
- Weindruch R & R Walford. 1988. *The retardation of aging and disease by dietary restriction*. C Thomas. Springfield, Illinois, USA.
- Yu J & J Auwerx. 2009. The Role of Sirtuins in the Control of Metabolic Homeostasis. *Integrative Physiology: Ann NY Acad Sci* 1173: E10-E19.
- Yubero P, E Hondares, C Carmona, M Rossell, F González, R Iglesias, M Giralt, F Villarroya. 2004. The developmental regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression in the liver is partially dissociated from the control of gluconeogenesis and lipid catabolism. *Endocrinology* 145 (9): 4268-4277.