



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN  
DE LA MIOSTATINA EN LA ALMEJA MANO DE  
LEÓN *Nodipecten subnodosus* Y ANÁLISIS DE SU  
EXPRESIÓN EN DIPLOIDES Y TRIPLOIDES

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
( Orientación Acuicultura )

Presenta

**ROSA MARÍA MORELOS CASTRO**

La Paz, Baja California Sur, Enero de 2011

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 14 del Mes de Enero del 2011, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Aislamiento y caracterización del gen de la miostatina en la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* y análisis de su expresión en diploides y triploides"**

Presentada por la alumna:

Rosa María Morelos Castro

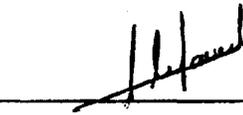
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Acuicultura

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

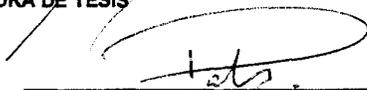
### LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Ana María Ibarra Humphries  
DIRECTORA DE TESIS



Dra. Silvia Alejandra García Gasca  
CO-TUTORA



Dra. Elena Palacios Mechetnov  
CO-TUTORA



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **Directora:**

Dra. Ana María Ibarra Humphries

CIBNOR, La Paz, B. C. S.

### **Co-tutores:**

Dra. Silvia Alejandra García Gasca

CIAD, Unidad Mazatlán, Sin.

Dra. Elena Palacios Mechetnov

CIBNOR, La Paz, B. C. S.

## **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

Dra. Ana María Ibarra Humphries

Dra. Silvia Alejandra García Gasca

Dra. Elena Palacios Mechetnov

## **JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

Dra. Ana María Ibarra Humphries

Dra. Silvia Alejandra García Gasca

Dra. Elena Palacios Mechetnov

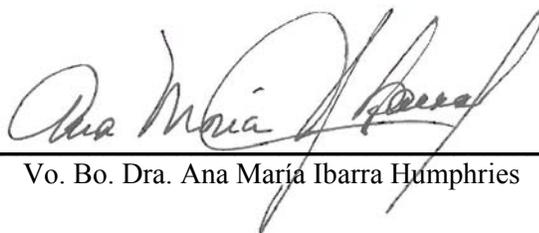
Dr. Pedro E. Saucedo Lastra (Suplente)

## RESUMEN

La almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* se considera un molusco con un importante potencial para su acuicultura en el Noroeste de México. Con la finalidad de incrementar la productividad en su cultivo se han desarrollado tecnologías como la triploidía, la cual ha sido asociada con un mejor crecimiento y peso del músculo aductor en moluscos pectínidos así como con una hipertrofia de las fibras musculares. Sin embargo en la almeja mano de león *N. subnodosus* no se ha observado un patrón consistente del crecimiento entre diploides y triploides como ha sido observado en otras especies. Existen diferentes hipótesis para explicar la ventaja que presentan los moluscos triploides sobre los diploides en crecimiento (mayor heterocigosidad; esterilidad y mayor disponibilidad de energía para crecimiento; e incremento en número y tamaño de células o hiperplasia e hipertrofia). En este trabajo se planteó una nueva hipótesis: que cuando ocurre un mejor crecimiento esto es resultado de una hipertrofia en células musculares de triploides, y esto se asocia a una expresión génica diferencial entre diploides y triploides, en particular de un gen conocido como controlador del crecimiento muscular. Tal gen es el gen de la *miostatina* o factor de crecimiento y diferenciación (*gdf-8*). Este gen pertenece a la superfamilia de factores transformantes de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) y su proteína actúa como regulador negativo del crecimiento, cuyo efecto ha sido demostrado por la hipertrofia e hiperplasia observada en algunos vertebrados mutantes o sub-expresando este gen, mientras que la sobre-expresión del mismo ha sido asociada con una atrofia muscular y pérdida de masa corporal. En el presente estudio se buscó establecer si existía una asociación entre la hipertrofia y la expresión diferencial del gen de la *miostatina* en diploides y triploides de almeja *N. subnodosus*. Se aisló y caracterizó la secuencia del transcrito de la *miostatina* (*MSTN*) en *N. subnodosus* a partir de las secuencias existentes para otros dos pectínidos, *Argopecten irradians* y *Chlamys farreri*. A partir de tal secuencia, se localizó la expresión de la *MSTN* por hibridación *in situ* en las células del músculo aductor tanto de diploides como triploides, específicamente en el sarcoplasma de las fibras musculares estriadas. Así mismo se cuantificó por PCR en tiempo real (qPCR) la abundancia del transcrito en triploides y diploides en diferentes etapas de su crecimiento y se evaluó la expresión relativa del mismo en diferentes tejidos al final de las evaluaciones de crecimiento. Se encontró que la expresión del gen de la *miostatina* en músculo aductor (estriado) difiere entre diploides y triploides, con los últimos presentando una menor expresión que los diploides, aunque las diferencias de expresión a lo largo de la evaluación de crecimiento variaron en significancia, encontrándose un incremento significativo en la expresión de la *MSTN* al final de la evaluación, Ago-09. Con estos resultados, y dado que los diploides presentaron menor peso de músculo aductor que los triploides, se puede concluir que el papel del gen de la *miostatina* en *N. subnodosus* es de regulador negativo del crecimiento como ha sido observado en otras especies de vertebrados. Sin embargo, para establecer si existía una asociación entre la expresión de la *MSTN* y la hipertrofia y/o hiperplasia de fibras musculares estriadas, durante los dos últimos meses de la evaluación de crecimiento (Jun-09 y Ago-09) se evaluaron tanto el tamaño como el número de fibras por área total del músculo aductor (estriado) en diploides y triploides. Se encontró un mayor tamaño (hipertrofia) de las fibras musculares en los triploides que en los diploides en ambos meses, pero el número de fibras en el músculo, que fue mayor en los triploides en Jun-09 decreció en Ago-09 a números significativamente menores que en los diploides, aunque en estos últimos también decreció, esto es, se observó una atrofia muscular. El decremento en número de fibras entre Jun-09 y Ago-09 para ambas ploidías se asoció con: (a) condiciones ambientales adversas en Ago-09 cuando la temperatura incrementó a 28.9 °C y la disponibilidad de alimento decreció a menos de 0.49 mg clorofila- $a\ m^{-3}$ , (b) el desove de los diploides, y (c) el mes en el cual la expresión de la *MSTN* incrementó y fue la más alta irrespectivo de la ploidía. Por otro lado, y contrariamente a lo esperado dada la atrofia muscular observada en Ago-09, al evaluar por técnicas histoquímicas los carbohidratos en músculo, estos mostraron un incremento significativo entre Jun-09 y Ago-09 en ambas ploidías. Lo anterior, así como

los resultados de la evaluación de la expresión de la *MSTN* entre tejidos, realizada únicamente durante este último mes, la cual indicó que el gen de la *miostatina* se expresó diferencialmente entre diploides y triploides en glándula digestiva y gónada adicionalmente al músculo aductor, con una mayor expresión en diploides que triploides, permite concluir que adicionalmente al papel del gen de la *miostatina* como regulador negativo del crecimiento muscular, este gen participa posiblemente en la regulación de vías metabólicas en músculo, así como también en otros tejidos. Los resultados obtenidos en este trabajo pueden tener aplicaciones futuras inmediatas en la selección al utilizar la expresión diferencial del gen de la *miostatina* entre individuos como un marcador genético asociado directamente al fenotipo ‘peso de músculo aductor’.

Palabras clave: pectínido, crecimiento, músculo aductor, gen de la *miostina*, diploide, triploide



---

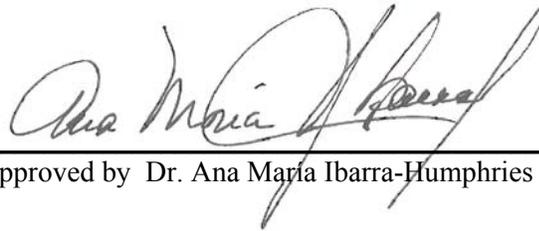
Vo. Bo. Dra. Ana María Ibarra Humphries

## ABSTRACT

The lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus* is considered a mollusk species with an important potential for aquaculture in northwest Mexico. Because other triploid pectinids are known to grow better than diploids, showing larger adductor muscles and a muscle fiber hypertrophy, triploid technologies aimed to increase its yield have been developed. However, in contrast to other scallop species, no consistent differential pattern of growth has been found when evaluating diploid and triploid lion-paw scallops. Several hypotheses have been proposed to explain the advantage of triploid mollusks over diploids (increased heterozygosity; sterility resulting in a surplus of energy for growth; and increased cell size and number, or hypertrophy and hyperplasia). In this work a new hypothesis was proposed: when triploids grow larger than diploids it is because there is hypertrophy of muscle cells and this can be associated with a differential gene expression, particularly of one gene known as a muscle growth regulator. Such a gene is the *myostatin* or *growth and differentiation factor-eight* (*gdf-8*). The *myostatin* gene belongs to the superfamily of transforming growth factors beta (TGF- $\beta$ ), and its protein acts as a negative regulator of growth as demonstrated in vertebrates by the hypertrophy and hyperplasia occurring in non-expressing or low-expressing mutants, and the muscular atrophy and loss of muscle mass seen in individuals over-expressing it. The possible association between hypertrophy and a differential expression of *myostatin* (*MSTN*) between diploid and triploid lion-paw scallop's *N. subnodosus* was evaluated in this work. First, the partial sequence of the *MSTN* transcript in *N. subnodosus* was isolated and characterized utilizing the available sequences for two other pectinids: *Argopecten irradians* & *Chlamys farreri*. With the isolated sequence, the *MSTN* transcript was localized in the striated adductor muscle cells of diploid and triploids by *in situ* hybridization, finding it specifically in the sarcoplasm of muscle fibers. Quantification of the *MSTN* transcript by real time PCR (qPCR) was done for striated muscle tissues sampled at consecutive ages during growout of diploids and triploids, as well as for five tissues sampled only at the end of the growout evaluation (Aug-09). A differential expression of the *myostatin* gene was found between diploids and triploids, with the last ones expressing less than diploids, although differences between growout dates/samples varied in significance, and a significant increase in *MSTN* expression was seen at the end of the growout evaluation, Aug-09. With these results and the fact that diploids had smaller adductor muscle weights than triploids, it can be concluded that the *myostatin* gene in *N. subnodosus* has a role as a negative regulator of growth, just as it has been reported for several vertebrate species. However, to further establish if an association between the expression of *MSTN* and muscle fiber hypertrophy or hyperplasia existed, the size and number of striated fibers per muscle were also estimated for diploids and triploids sampled during the last two evaluations, in Jun-09 and Aug-09. It was found that triploids had larger fiber size (hypertrophy) than diploids during both months evaluated, but the number of fibers per muscle in triploids, which was larger than in diploids in Jun-09, decreased in Aug-09 to less fibers than those in diploids, for which fibers also decreased during Aug-09 indicating that a muscle atrophy had occurred. The decrease in fibers number for both ploidies between Jun-09 and Aug-09 was associated with (a) poor environmental conditions occurring in Aug-09 when an increase in temperature to 28.9 °C and a decrease in chlorophyll-*a* 0.49 mg m<sup>-3</sup> or available food were recorded at the culture site, (b) the spawning of diploids, and (c) a large and significantly increase in *MSTN* expression in adductor muscle of both ploidies. On the other hand and contrary to what would be expected because the observed muscle atrophy in Aug-09, the carbohydrates evaluated by histochemistry techniques in muscle increased significantly between Jun-09 and Aug-09 in both ploidies. These results, as well as the results on expression of *MSTN* between tissues evaluated only during the last month or Aug-09, that indicated that the *myostatin* gene expressed differentially between diploids and triploids in digestive gland and gonad, with a larger expression in diploids than triploids, allows to conclude that additionally to the role of the *myostatin* gene as a negative regulator of muscle growth, this gene is probably participating in regulation of metabolic pathways in muscle and other

tissues. The results of this work have potential immediate applications for selective breeding when utilizing the differential *myostatin* gene expression between individuals as a genetic marker directly associated with 'adductor muscle weight'.

Key words: pectinid, growth, adductor muscle, *myostatin* gene, diploid, triploid



---

Approved by Dr. Ana María Ibarra-Humphries

### **Dedicado...**

A mi madre que amo con toda mi alma, gracias por siempre apoyarme en todo y siempre estar conmigo, éste y todos mis logros son por y para ustedes también. A mi familia entera (Adolfo, Ana María, Maricela, Nena y Monse; Gera, Bere, Carlos, Arturo, Pepe, Fer, Santi y anexas) por hacerme sentir tan amada cuando estoy con ellos, aunque no sea muy seguido, nunca se olvidan de mí, los amo. A mi familia de La Paz, Doña Tere y Don Fran por su gran apoyo siempre. A mis amigos de ayer, de hoy y de siempre, de aquí y de allá, por su apoyo y amistad. A Ana María por su increíble paciencia hacia conmigo, infinitamente gracias!!!! Y a todas las personas de mi vida que no permiten que se me olvide de donde vengo, donde estoy y hacia donde quiero ir.

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca de maestría otorgada (No. 224237) y al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por las facilidades prestadas para el desarrollo de esta tesis.

Al Proyecto SEMARNAT 2006-01: “Modelo biológico para alcanzar un balance entre la conservación y el aprovechamiento sustentable de los recursos marinos en reservas y parques naturales. Caso de estudio: almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*)” y al Proyecto CONACYT-CB 2005: “Mapa genético y análisis para la detección de un QTL asociado al peso del músculo aductor en el molusco pectínido almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*)” a cargo de la Dra. Ana María Ibarra Humphries por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

A la Dra. Ana María Ibarra por su apoyo, enseñanza, confianza, amistad, paciencia y todo lo que se me pueda ocurrir en este momento, pero ni con eso voy a poder agradecerle todo lo que has hecho por mí, no nada más en mi formación académica sino también como persona, te quiero y admiro mucho, MUCHAS GRACIAS!!!!!!

A la Dra. Alejandra García por su contribución en este trabajo, por haberme permitido la estancia en el laboratorio de Biología Molecular en las instalaciones del CIAD de Mazatlán, por las clases y por todo el apoyo brindado. A Itzel, Mario y Rubí por todo su apoyo. A la Sra. Yolanda por abrirme las puertas de su casa, a Itzel, Martha y Catherine por la amistad brindada. Al Banco Santander por la beca recibida para dicha estancia.

A La Dra. Elena Palacios por su contribución a la mejora de la presente tesis.

Al Dr. Eduardo Vivas por su apoyo para la realización de los análisis histoquímicos.

Al laboratorio de Genética y Mejoramiento de Animal Acuícola que ha sido mi casa durante estos cinco años y medio, así como a sus técnicos sin los cuales no funcionarían igual las cosas: la M. en C. Susana Ávila y el M. en C. José Luis Ramírez, gracias.

A los chicos del laboratorio “de abajo” Tavo, Beto y Gabriel por los amenos muestreos y al resto de los compañeros de laboratorio: Raúl, Sara, Laura, Ana María Millán, Nacho. Ah! y aquellos que ya no están en el lab., pero siempre serán de él: Miguel, Fer y Roberto.

Al laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR especialmente a la M. en C. Carmen Rodríguez y a la Técnico Eulalia Meza por el apoyo recibido, por esas charlas durante los largos procesos de tinción en las que el tiempo se te hacia nada.

Al laboratorio de Biotecnología de Organismos Marinos por el espacio y apoyo proporcionado, gracias Hever!!!. Así como a los laboratorios de Biología Molecular de Plantas y Patogénesis Microbiana por el uso de sus equipos, gracias Chula!!!

A Susana, Clarisa, Pedro, José Luis y Carmen, por su amistad, porque siempre están ahí para lo que sea y cuando sea, y porque son y seguirán siendo para mí un gran apoyo y ejemplo, los quiero mucho y que la amistad perdure por siempre!!!

A los compañeros y amigos que la maestría dejó: Alberto y Melissa con Cami, Coyntna, Miguel, Gorette, Merit, David, Vero, Dany, Viri, Paty y Sergio.

A los amigos que siempre están ahí, lejos pero ahí, siempre apoyándome y ofreciéndome su amistad: Ana, Adriana, Leo, Miguel, Tito, Erick, Flor y Edgar, Luis y Coral, Lucy e Iván, gracias por esos buenos ratos de “celebración” y mucha risa, para lo cual siempre hay un buen pretexto, esperando que sigamos juntos mucho tiempo.

A todos en mi vida, que según la estadística la hacen significativa, gracias!!!!

## CONTENIDO

		<b>Página</b>
	<b>Resumen</b> .....	i
	<b>Abstract</b> .....	iii
	<b>Dedicatoria</b> .....	v
	<b>Agradecimientos</b> .....	vi
	<b>Contenido</b> .....	vii
	<b>Lista de Figuras</b> .....	x
	<b>Lista de Tablas</b> .....	xiv
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	1
2.1.	El gen de la <i>miostatina</i> ( <i>mstn</i> - <i>GDF-8</i> ) y la proteína que genera: la <i>miostatina</i> ( <i>MSTN</i> ).....	5
2.2.	Regulación de la expresión del gen de la <i>miostatina</i> .....	6
2.3.	Mecanismo de acción de la <i>MSTN</i> en el control del crecimiento muscular.....	8
2.4.	Metabolismo y la <i>MSTN</i> .....	10
2.5.	El gen de la <i>miostatina</i> ( <i>mstn</i> ) en invertebrados.....	11
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
4.1.	Objetivo General.....	15
4.2.	Objetivos específicos.....	15
<b>5.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	15
<b>6.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	16
6.1.	Origen de Grupos Experimentales.....	16
6.2.	Muestreo de Tejidos.....	19
6.2.1.	Tejidos para análisis de expresión génica de la <i>miostatina</i> .....	19
6.2.2.	Tejidos para análisis de hibridación <i>in situ</i> e histoquímica.....	19
6.3.	Aislamiento, hibridación <i>in situ</i> , y análisis de expresión de la <i>miostatina</i> .....	20
6.3.1.	Caracterización del transcrito del gen de la <i>miostatina</i> ( <i>MSTN</i> ) en <i>Nodipecten subnodosus</i> .....	20
6.3.1.1.	Diseño de Cebadores (primers).....	20
6.3.1.2.	Caracterización parcial del transcrito del gen de la <i>MSTN</i> en <i>Nodipecten subnodosus</i> .....	21

6.3.2.	Localización del transcrito de la <i>miostatina (MSTN)</i> en músculo aductor de <i>Nodipecten subnodosus</i> por hibridación <i>in situ</i> .....	23
6.3.2.1.	Generación de sonda de hibridación para la <i>MSTN</i> .....	23
6.3.2.2.	Hibridación y detección.....	25
6.3.3.	Análisis de la expresión del gen de la <i>miostatina (MSTN)</i> por qPCR en tiempo real.....	26
6.3.3.1.	Diseño de cebadores para el gen de la <i>miostatina (MSTN)</i> y genes constitutivos de referencia.....	26
6.3.3.2.	Caracterización cualitativa por PCR punto final, estandarización de la reacción por PCR cuantitativo (qPCR) y análisis de los genes de referencia.....	28
6.3.3.3.	Cuantificación de la expresión del gen de la <i>miostatina (MSTN)</i> en músculo, manto, gónada, glándula digestiva y branquia de organismos diploides y triploides.....	29
6.3.3.4.	Cuantificación de la expresión del gen de la <i>miostatina (MSTN)</i> en músculo aductor de organismos diploides y triploides en diferentes etapas del desarrollo.....	31
6.4.	Análisis Histoquímicos.....	33
6.4.1.	Estimación de componentes bioquímicos en músculo aductor de organismos diploides y triploides.....	33
6.4.2.	Estimación de lípidos y carbohidratos.....	33
6.5.	Análisis de Hipertrofia e Hiperplasia.....	36
6.5.1.	Cuantificación del tamaño y número de fibras musculares en organismos diploides y triploides .....	36
6.5.1.1.	Estimación del tamaño de las fibras musculares.....	36
6.5.1.2.	Estimación del número de fibras musculares.....	37
6.5.2.	Análisis de hipertrofia e hiperplasia muscular.....	39
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	40
7.1.	Aislamiento, Hibridación <i>In Situ</i> y Análisis de Expresión de la <i>Miostatina</i> .....	40
7.1.1.	Obtención de secuencia parcial del transcrito del gen de la <i>MSTN</i> en <i>Nodipecten subnodosus</i> .....	40
7.1.2.	Localización del transcrito de la <i>miostatina (MSTN)</i> en músculo aductor de <i>Nodipecten subnodosus</i> por hibridación <i>in situ</i> .....	42
7.1.3.	Expresión del gen de la <i>miostatina (MSTN)</i> por qPCR de tiempo real....	44
7.1.3.1.	Caracterización cualitativa por PCR de punto final.....	44

7.1.3.2.	Estandarización de la reacción por PCR cuantitativo (qPCR).....	45
7.1.3.3.	Análisis de los genes de referencia.....	47
7.1.3.4.	Cuantificación de la expresión del gen de la <i>MSTN</i> en diferentes tejidos de organismos diploides y triploides: músculo, manto, gónada, glándula digestiva y branquias.....	47
7.1.3.5.	Cuantificación de la expresión del gen de la <i>miostatina</i> ( <i>MSTN</i> ) en músculo aductor de organismos diploides y triploides en diferentes etapas de su crecimiento.....	49
7.2.	Análisis Histoquímicos.....	50
7.2.1.	Estimación de lípidos en músculo aductor de organismos diploides y triploides.....	50
7.2.2.	Estimación de carbohidratos en músculo aductor de organismos diploides y triploides.....	52
7.3.	Análisis de hipertrofia e hiperplasia muscular.....	54
7.3.1.	Análisis de hipertrofia.....	54
7.3.2.	Análisis de hiperplasia y área muscular.....	55
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>59</b>
8.1.	Crecimiento de diploides y triploides en función a las condiciones ambientales.....	60
8.2.	Localización muscular y expresión diferencial tisular del gen de la <i>miostatina</i> en diploides y triploides.....	65
8.3.	Hipertrofia sin hiperplasia, atrofia muscular, y componentes bioquímicos en músculo.....	73
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>80</b>
9.1.	Conclusiones.....	80
9.2.	Recomendaciones.....	81
<b>10.</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>82</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>95</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Fig. 1</b> Factores involucrados en la regulación de la <i>miostatina</i> (tomado de Dominique y Gérard, 2006).....	8
<b>Fig. 2</b> Modelo de acción de la <i>miostatina</i> sobre el crecimiento y diferenciación muscular (modificado de Thomas <i>et al.</i> , 2000 y Langley <i>et al.</i> , 2002).....	9
<b>Fig. 3</b> Corte histológico transversal (4 $\mu$ m) de músculo aductor de almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> ; a) músculo liso, b) músculo estriado; 1 a 4 denotan los cuadrantes delimitados para la digitalización de imágenes.....	34
<b>Fig. 4</b> Imágenes digitalizadas de cortes transversales de músculo estriado de la almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> . (A) fibras musculares en un organismo diploide y (B) fibras musculares en un organismo triploide.....	37
<b>Fig. 5</b> Imagen digitalizada (60x) de cortes transversales de músculo de la almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> para estimar el número de fibras musculares.....	38
<b>Fig. 6</b> Imagen escaneada de un corte transversal del músculo aductor completo de la almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> . a) músculo liso (no incluido en diámetro promedio) y b) músculo estriado.....	38
<b>Fig. 7</b> Traducción conceptual de la secuencia parcial obtenida de la <i>MSTN</i> en <i>N. subnodosus</i> . En naranja se señala la localización de los cebadores degenerativos y específicos utilizados para la amplificación del gen de la <i>MSTN</i> . En <b>negritas</b> se muestra el sitio de procesamiento proteolítico ( <b>RXXXR</b> ) de la <i>MSTN</i> . En azul el dominio N-terminal del pro-péptido y en verde el dominio C-terminal donde se encuentra el ligando activo.....	41
<b>Fig. 8</b> Alineamiento de la secuencia obtenida de la <i>miostatina</i> en <i>N. subnodosus</i> ( <i>MSTN</i> ) de 187 aminoácidos con la secuencia de <i>Argopecten irradians</i> y de <i>Chlamys farreri</i> . (*) indica los aminoácidos similares; (:) indica las sustituciones conservadas; y (.) indica las sustituciones semi-conservadas entre las secuencias. Los colores de los aminoácidos indican las propiedades fisicoquímicas de los mismos.....	42
<b>Fig. 9</b> Hibridación <i>in situ</i> de la <i>miostatina</i> ( <i>MSTN</i> ) en cortes longitudinales de músculo aductor de un organismo diploide (2n) de <i>N. subnodosus</i> . (A, B) La señal de la hibridación de la <i>MSTN</i> con la sonda “antisentido” fue encontrada a lo largo de las fibras del músculo estriado, en el sarcoplasma de las fibras musculares. La hibridación <i>in situ</i> con la sonda “sentido” (C), no mostró señal. Barra de escala A & C) 20 $\mu$ m, B) 10 $\mu$ m.....	43

- Fig. 10** Hibridación *in situ* de la *miostatina* (MSTN) en cortes longitudinales de músculo aductor de un organismo triploide (3n) de *N. subnodosus*. (A, B) La señal de la hibridación de la MSTN con la sonda “antisentido” fue encontrada a lo largo de las fibras del músculo estriado, en el sarcoplasma de las fibras musculares. La hibridación *in situ* con la sonda “sentido” (C), no mostró señal. Barra de escala = A & C) 20  $\mu$ m, B) 10  $\mu$ m 43
- Fig. 11** Productos de amplificación obtenidos por PCR de punto final de los genes (A) MSTN, (B)  $\beta$ -actina y(C) rpL8, con ADNc de músculo aductor de 8 organismos diploides del muestreo de Dic-08. Cada reacción incluye un control negativo (C-). M se refiere al marcador de peso molecular  $\Phi$ x174/HaeIII..... 44
- Fig. 12** Curvas de amplificación de diluciones seriales de ADNc de una muestra de músculo aductor de *N. subnodosus* para el gen de  $\beta$ -actina..... 45
- Fig. 13** Curvas logarítmicas de amplificación de diluciones seriales de ADNc de músculo aductor de diploides de *N. subnodosus* para los genes A) rpL8, B)  $\beta$ -actina y C) MSTN. Los Cq (del inglés *quantification cycle*) de cada dilución se muestran en las abscisas y el Log base 10 del número de copias de cada dilución se muestra en las ordenadas..... 46
- Fig. 14** Valores de estabilidad (*M*) obtenidos en *geNorm* a partir de valores de *Cq* o expresión de los genes de referencia rpL8 y  $\beta$ -Actina analizados con el programa. Valores mayores de 1.5 muestran menor estabilidad. .... 47
- Fig. 15** Expresión relativa de la *MSTN* ( $2^{-\Delta Cq}$ ) en los tejidos branquia, gónada, glándula digestiva, manto y músculo aductor de organismos diploides y triploides de *N. subnodosus* muestreados en el mes de Ago-09. Los análisis individuales por tejido para determinar diferencias entre ploidías para cada tejido removiendo el efecto aleatorio de variación individual se presentan en la tabla inferior (la contribución porcentual de los individuos a la varianza total se incluye en la tabla; en **negritas** se denotan los efectos o factores significantes; na = no aplica por ser factor fijo). Los resultados del ANOVA anidado completo se incluyen dentro de la gráfica (letras mayúsculas diferentes en la parte superior indican diferencias significativas entre tejidos y letras minúsculas diferentes indican diferencias entre ploidías dentro de tejidos)..... 48
- Fig. 16** Expresión relativa de la *MSTN* ( $2^{-\Delta Cq}$ ) en músculo aductor de organismos diploides y triploides de *N. subnodosus*. Los análisis individuales por mes para determinar diferencias entre ploidías removiendo el efecto aleatorio de variación individual se presentan en la tabla inferior (la contribución porcentual de los individuos a la varianza total se incluye en la tabla; las diferencias entre diploides y triploides se denotan en la gráfica con asteriscos; en **negritas** se denotan los efectos o factores significantes; na = no aplica por ser factor fijo). Los resultados del ANOVA anidado completo se incluyen dentro de la gráfica (Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre meses y letras minúsculas diferentes indican diferencias entre ploidías dentro de meses)..... 50

- Fig. 17** Lípidos: Micrografías (20x) de corte transversal del músculo aductor de: A) diploides -2n- y B) triploides -3n- de la almeja mano de león *N. subnodosus* muestreadas en Junio 09 y teñidas con Negro Sudán B..... 51
- Fig. 18** Abundancia relativa de lípidos por área en músculo aductor de organismos diploides y triploides de *N. subnodosus* con el método de identificación automática de píxeles. Se incluyen los resultados del ANOVA. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en las ploidías dentro de mes 52
- Fig. 19** Carbohidratos: Micrografías (20x) de corte transversal del músculo aductor de A) diploides -2n- y B) triploides -3n- de la almeja mano de león *N. subnodosus* muestreadas en Junio 09 y teñidas con la técnica histoquímica PAS (Periodic Acid Schiff)..... 53
- Fig. 20** Abundancia relativa de carbohidratos por área en músculo aductor de organismos diploides y triploides de *N. subnodosus* con el método de identificación automática de píxeles. Se incluyen los resultados del ANOVA. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significantes entre los meses evaluados..... 53
- Fig. 21** Fibras Musculares: Micrografías (20x) de corte transversal del músculo aductor de a) diploides -2n- y b) triploides -3n- de la almeja mano de león *N. subnodosus* muestreadas en Junio 09 y teñidas con la tinción Tricrómica de Masson..... 54
- Fig. 22** Análisis del tamaño de fibras musculares estriadas en el músculo aductor de organismos diploides y triploides de *N. subnodosus*. Se incluyen los resultados del ANOVA. Letras diferentes en las medias por ploidía y mes indican diferencias estadísticamente significativas entre diploides y triploides..... 55
- Fig. 23** Cuantificación de Fibras musculares: Micrografías (60x) de corte transversal del músculo aductor de a) diploides (2n) y b) triploides (3n) de la almeja mano de león *N. subnodosus* teñidas con la tinción Tricrómica de Masson para la diferenciación del número de fibras musculares y tamaño del músculo aductor..... 56
- Fig. 24** Análisis del número de fibras musculares por mm<sup>2</sup> de organismos diploides y triploides de *N. subnodosus*. Se incluyen los resultados del ANOVA. Letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre ploidías dentro de mes. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre meses..... 56
- Fig. 25** Análisis del área del músculo aductor de organismos diploides y triploides de *N. subnodosus*. Se incluyen los resultados del ANOVA. Letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre ploidías dentro de mes. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre meses..... 57
- Fig. 26** Análisis del número de fibras o células musculares en relación al área total del músculo aductor de organismos diploides y triploides de *N. subnodosus*. Se incluyen los resultados del ANOVA. Letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre ploidías dentro de mes. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre meses..... 58

<b>Fig. 27</b>	Peso de músculo aductor de <i>N. subnodosus</i> diploide y triploide observados durante el cultivo en Bahía de Loreto. Sin sombreado están aquellos meses en los que se evaluó la expresión de la <i>mstn</i> . Tomado de Ramírez-Arce (2009).....	60
<b>Fig. 28</b>	Índices musculares y gonadales obtenidos para almeja <i>N. subnodosus</i> diploide y triploide de Dic-08 a Ago-09. Tomado de Ramírez-Arce (2009) para reflejar los meses que corresponden a este trabajo (sin sombrear en gris).....	62
<b>Fig. 29</b>	Peso de biomasa de <i>N. subnodosus</i> diploide y triploide observados durante el cultivo en Bahía de Loreto. Sin gris sombreado están aquellos meses en los que se evaluó la expresión de la <i>miostatina</i> . Tomado de Ramírez-Arce (2009).....	62
<b>Fig. 30</b>	Variables ambientales de temperatura y clorofila- <i>a</i> registradas para Bahía de Loreto, B. C. Sur, México, para el periodo de tiempo evaluado.....	63
<b>Fig. 31</b>	Incrementos (y decremento) en peso de músculo aductor (a) y biomasa total (b) de <i>N. subnodosus</i> entre las edades evaluadas, con las variables ambientales de temperatura y clorofila- <i>a</i> registradas para Bahía de Loreto, B. C. Sur, para el periodo de tiempo evaluado. Tomado de Ramírez-Arce (2009).....	70

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla I.</b>	Cebadores utilizados para el aislamiento y clonación del gen de la <i>MSTN</i> en <i>Nodipecten subnodosus</i> .....	21
<b>Tabla II.</b>	Secuencias de los cebadores diseñados para el análisis de expresión del gen de la <i>MSTN</i> y los genes constitutivos de referencia en <i>Nodipecten subnodosus</i> ( <i>MSTN</i> = <i>miostatina</i> ; RPL8= riboproteína L8; $\beta$ Act= $\beta$ Actina).....	27
<b>Tabla III.</b>	Eficiencia de amplificación y valores de $R^2$ obtenidos a partir de las curvas logarítmicas de amplificación de los genes de referencia rpL8 y $\beta$ -Actina y la <i>MSTN</i> ( <i>miostatina</i> ).....	45

## 1. INTRODUCCIÓN

La almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* es la especie más grande de la familia Pectinidae en aguas tropicales del Oeste Americano (Keen, 1971). La pesquería de esta especie se localiza principalmente en el Pacífico, con la mayor abundancia en la Laguna Ojo de Liebre en Baja California Sur, aunque se le localiza también en el Golfo de California, tanto en las costas de la Península de Baja California como las de Sonora. Dos poblaciones genéticamente distintas han sido identificadas, la de Laguna Ojo de Liebre en el Pacífico, y la del Golfo de California que incluye los diferentes bancos localizados a lo largo del mismo (Petersen *et al.*, 2010). Esta especie se ha convertido en un importante recurso pesquero en Laguna Ojo de Liebre por su abundancia, las tallas que alcanza (longitud máxima de 218 mm), y principalmente por el tamaño de su músculo aductor (Morales-Hernández y Cáceres-Martínez, 1996; Félix-Pico *et al.*, 1999). Actualmente se considera una especie con un importante potencial para su cultivo en México debido a su alta tasa de crecimiento y a que alcanza su talla comercial en un tiempo relativamente corto (Racotta *et al.*, 2003; Maldonado-Amparo *et al.*, 2004), así como su fácil adaptación a las condiciones de cultivo y al excelente sabor de su músculo aductor (Osuna-García *et al.*, 2008).

## 2. ANTECEDENTES

Con la finalidad de incrementar la productividad en el cultivo de la almeja mano de león se han desarrollado diversas tecnologías, entre ellas la inducción a la triploidía. El objetivo principal de la aplicación de esta biotecnología es incrementar la tasa de crecimiento y el tamaño del músculo aductor (Ruíz-Verdugo *et al.*, 2000). Estas características se adscriben principalmente al hecho de que los organismos triploides no llegan a la madurez sexual, o presentan una gametogénesis inhibida. Se ha propuesto que la inhibición de la gametogénesis en pectínidos como la almeja *Argopecten ventricosus*, es una consecuencia de problemas presentados durante la meiosis al encontrar tres cromosomas homólogos durante la sinapsis y recombinación, con una posible activación de mecanismos de

“*checkpoint*” o control de la fidelidad del ciclo meiótico (Maldonado-Amparo e Ibarra 2002a y 2002b), resultando en una parcial o total esterilidad. Los organismos triploides al no utilizar energía para su reproducción, cuentan con un excedente de energía para el crecimiento. Una aparente no movilización de reservas energéticas, particularmente de carbohidratos del músculo hacia la gónada ha sido observada en triploides de *A. ventricosus* (Ruíz-Verdugo *et al.*, 2001b; Palacios *et al.*, 2004) y en *N. subnodosus* (Racotta *et al.*, 2008). Dicha esterilidad también da a los organismos triploides la ventaja de poder ser cultivados en áreas protegidas, ya que al no poder reproducirse no representan un riesgo para las poblaciones naturales con las que pudiera haber intercambio genético (Ramírez *et al.*, 2009).

Sin embargo, la esterilidad *per se* no siempre confiere ventajas en el crecimiento. Diferentes estudios realizados para evaluar el efecto de la triploidía sobre el crecimiento en especies de pectínidos como *N. subnodosus* y *A. ventricosus*, no han obtenido resultados consistentes con respecto a la ventaja en el crecimiento que presentan los organismos triploides sobre los diploides. Por un lado, Ruíz-Verdugo *et al.* (2000) al evaluar el crecimiento de *A. ventricosus* en el estero de Rancho Bueno en Bahía Magdalena, Baja California Sur, observan una parcial esterilidad de los triploides de la especie, así como una ventaja del 80% en el peso del tejido total y del 161% del peso del músculo aductor de los triploides sobre los diploides evaluados. Por otro lado, Maldonado-Amparo *et al.* (2004) al evaluar el crecimiento de *N. subnodosus* en el mismo sitio, aunque observan una esterilidad completa en los organismos triploides, estos presentaron pesos y medidas menores que los grupos de diploides; en este caso los diploides presentaron un peso del tejido total del organismo 10% mayor que los triploides y los triploides sólo un 13% más de peso de músculo aductor que los diploides, infiriendo que estos resultados pueden estar relacionados con la alta productividad primaria del sitio y/o a la estrategia reproductiva del tipo oportunista adoptada por la población para dicho sitio de cultivo. El efecto de la productividad ha sido demostrado en un estudio realizado por Ramírez *et al.* (2009), en donde se observó que los organismos triploides tienen una mayor capacidad de respuesta en crecimiento en sitios como Bahía de Loreto, donde las condiciones ambientales son más extremas que en sitios como Bahía Magdalena. Los resultados indicaron que los

organismos triploides tuvieron un mayor crecimiento que los diploides principalmente en los meses de verano, cuando las temperaturas son mayores y hay una drástica disminución en la productividad primaria o en el alimento de estos organismos.

Los resultados anteriores son interesantes ya que hasta el momento, en pectínidos como la almeja mano de león *N. subnodosus* se ha observado que la movilización de las reservas somáticas hacia la reproducción depende de la disponibilidad del alimento en el medio. Esto es, si el sitio de cultivo presenta temporadas de baja productividad primaria, la estrategia de los organismos va a ser de almacenar y movilizar energía de sus tejidos, principalmente de la glándula digestiva (Arellano-Martínez *et al.*, 2004) y del músculo aductor (Barber y Blake, 1991; Brokordt *et al.*, 2004), hacia la formación y crecimiento de sus gametos, pero por el contrario, si el sitio presenta una alta productividad, va a verse disminuida esta movilización de energía debido a que esta puede ser adquirida del alimento presente en el sitio y no es necesario utilizar la almacenada (Ruíz-Verdugo *et al.*, 2001b; Racotta *et al.*, 2003; Palacios *et al.*, 2005, 2007; Racotta *et al.*, 2008). Debido a los resultados anteriores, el grupo de Ibarra-Humphries propuso que los organismos triploides de la almeja mano de león *N. subnodosus*, al no reproducirse, presentarían un mayor crecimiento que los diploides en sitios de baja productividad, ya que los últimos tienen que tomar de las reservas almacenadas en sus tejidos para el desarrollo de sus gónadas. Sin embargo, al llevar a cabo los estudios esto no fue lo observado, ya que la ventaja en crecimiento del triploide ocurrió incluso antes e independientemente del desarrollo gonadal (Ramírez *et al.*, 2009). Esto abrió otra pregunta en cuanto a la causa por la cual los triploides presentan una mayor talla o peso que los diploides: ¿se pueden asociar esas diferencias a una dosis y expresión génica diferencial entre diploides y triploides? Efectos de la ploidía sobre la expresión génica han sido reportados para especies vegetales principalmente, lo cual se introducirá mas adelante, después de presentar las hipótesis existentes que buscan explicar la ventaja en crecimiento de los poliploides, incluyendo a los triploides.

Adicionalmente a la hipótesis de la ventaja fisiológica asociada con la esterilidad en triploides, existen al menos otras dos hipótesis que buscan explicar la ventaja en

crecimiento que presentan los triploides sobre los diploides. Una de ellas, está basada en la ventaja de la elevada heterocigosidad de los triploides en general, donde potencialmente pueden ocurrir de dos a tres alelos diferentes por locus (Allendorf y Leary, 1984; Guo *et al.*, 1992; Beaumont *et al.*, 1995; Garnier-Géré *et al.*, 2002). La tercera hipótesis se basa en diferencias intrínsecas en el tamaño celular entre diploides y triploides, con los últimos presentando un mayor tamaño celular sin una disminución en el número de células (Guo y Allen, 1994) resultando en una mayor talla. En relación a esta última hipótesis, se ha observado en vertebrados que el incremento en el número de cromosomas en poliploides causa proporcionalmente un incremento en el tamaño de sus células, así como un incremento en el número de las mismas (Epstein, 1967), lo cual ha sido observado tanto en células humanas (Owens *et al.*, 1981; Chang *et al.*, 1983), como en peces (Suresh y Sheehan, 1998). Al incremento del tamaño de las células se le conoce como hipertrofia y al incremento en su número se le conoce como hiperplasia (Carlson, 2007). En invertebrados como los moluscos pectínidos, este fenómeno en tejido muscular ha sido estudiado sólo en una especie. Al realizar una comparación de células musculares entre organismos diploides y triploides de la almeja catarina *Argopecten ventricosus*, Palacios *et al.* (2004) reportan hipertrofia celular en los organismos triploides y un peso total del músculo de 123% mayor que el de los diploides, sin observar un incremento significativo en el número de células (hiperplasia) en relación al diámetro del músculo aductor. Se concluyó que estos resultados no apoyaban necesariamente la hipótesis de Guo y Allen (1994) y Guo *et al.* (1996) acerca del gigantismo que presentan las células de los moluscos triploides, debido a que la acumulación de reservas energéticas, pareada con una falta de movilización del músculo de triploides explicaba también la hipertrofia en células musculares. Sin embargo, los resultados recientes de Ramírez *et al.* (2009), en donde se ha observado un mayor crecimiento del músculo aductor en triploides de almeja *Nodipecten subnodosus* en condiciones ambientales pobres, y sin necesariamente estar pareado con un desarrollo gonádico en diploides, indican que otros factores adicionalmente a los fisiológico-reproductivos pueden estar interviniendo en las diferencias en crecimiento muscular entre diploides y triploides, entre ellos una expresión génica diferencial.

Por ejemplo, se sabe que la regulación de la expresión génica en organismos diploides está en constante homeostasis, la cual en organismos poliploides puede verse alterada por el incremento en el número de cromosomas y por tanto en dosis génica o número de genes (Auger *et al.*, 2005; Adams, 2007). La duplicación o incremento de genes, trae consigo cambios genéticos y epigenéticos que afectan la regulación de la expresión de genes, traduciéndose en nuevos patrones de expresión y por lo tanto en nuevas variantes fenotípicas (Osborn *et al.*, 2003; Adams y Wendell, 2005; Adams, 2007). Osborn *et al.* (2003) mencionan que “los cambios epigenéticos en los poliploides podrían provocar tanto la represión de genes como la expresión de genes que estaban reprimidos en los diploides”. Por lo que, entre otras posibles causas para las diferencias entre diploides y triploides, está la posible expresión diferencial de genes indirecta o directamente asociados con el crecimiento muscular.

### **2.1. El gen de la *miostatina* (*MSTN* - *GDF-8*) y la proteína que genera: la *miostatina* (*MSTN*)**

Estudios en animales de granja, como son ganado vacuno y bovino, han encontrado que el crecimiento muscular está fuertemente regulado, y que mutaciones, inactivando un gen con funciones de regulación negativa del crecimiento muscular, inducen fenotipos anormales en musculatura, como lo es la ‘doble musculatura’. Por análisis de segregación en progenies de estas especies se descubrió la existencia de un locus recesivo, que al presentarse en forma homocigota en los organismos, se observaba el fenotipo denominado ‘doble musculatura’ (Hanset y Michaux, 1985; Charlier *et al.*, 1995). El gen específico fue descrito por McPherron *et al.* (1997) en ratones, al cual denominaron ‘Factor 8 de crecimiento y diferenciación’ (*GDF8* por su siglas en inglés), encontrando que los ratones que no expresan el gen *GDF8* (llamados mutantes), presentaban una musculatura de dos a tres veces de mayor tamaño que los que sí lo expresan. Estos autores observaron adicionalmente que el incremento en la masa muscular o doble musculatura y el consecuente mayor tamaño resultaba de la combinación de una hipertrofia e hiperplasia de las células musculares presentes en los ratones mutantes, concluyendo que la función del

gen *GDF8* es de regular negativamente (o en otras palabras, inhibir) el crecimiento del músculo esquelético en animales no mutantes. Durante la misma década de los 90's se determinó que la “doble musculatura” observada de forma natural en el ganado bovino y vacuno de diferentes especies, era provocado por mutaciones en el mismo gen *GDF8* (Grobet *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; McPherron y Lee, 1997; Gill *et al.*, 2008), lo cual también ha sido observado en perros de la raza Whippet (Mosher *et al.*, 2007) y, aunque raramente, en humanos (Schuelke *et al.*, 2004; Castro-Gago *et al.*, 2007). Hoy en día el nombre científico aceptado para este gen es el de *miostatina* (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MSTN>).

El producto expresado del gen de la *miostatina* o *GDF-8* es la proteína llamada *miostatina* (*MSTN*), que pertenece a la superfamilia de genes reguladores denominados ‘factores transformantes de crecimiento  $\beta$ ’ (TGF- $\beta$ , por sus siglas en inglés). Esta superfamilia incluye un grupo de proteínas que se relacionan estructuralmente en diferentes especies de metazoarios y regulan una gran cantidad de actividades, como la proliferación, migración y apoptosis en diferentes tipos celulares (Gálvez-Gastelum *et al.*, 2004; Herpin *et al.*, 2004). Ortólogos del gen de la *miostatina* descrita en mamíferos han sido también encontrados en diferentes peces. A diferencia de los otros vertebrados, se ha reportado en peces la presencia de parálogos, o dos genes codificando para la *miostatina* (*MSTN-1* y *MSTN-2*) (Du, 2004) que ocurrieron por un evento de duplicación genómica hace aproximadamente 350 millones de años (Kerr *et al.*, 2005; Rodgers y Garikipati, 2008). En salmónidos, además, existen dos isoformas codificadas (*MSTN-1a* y *-1b*, y *MSTN-2a* y *-2b*) para cada uno de los dos genes duplicados en otros teleósteos, posiblemente derivados del evento de tetraploidización mas reciente que ocurrió en este grupo, entre 25 y 100 millones de años (Østbye *et al.*, 2001; Rescan *et al.*, 2001; Roberts y Goetz, 2001).

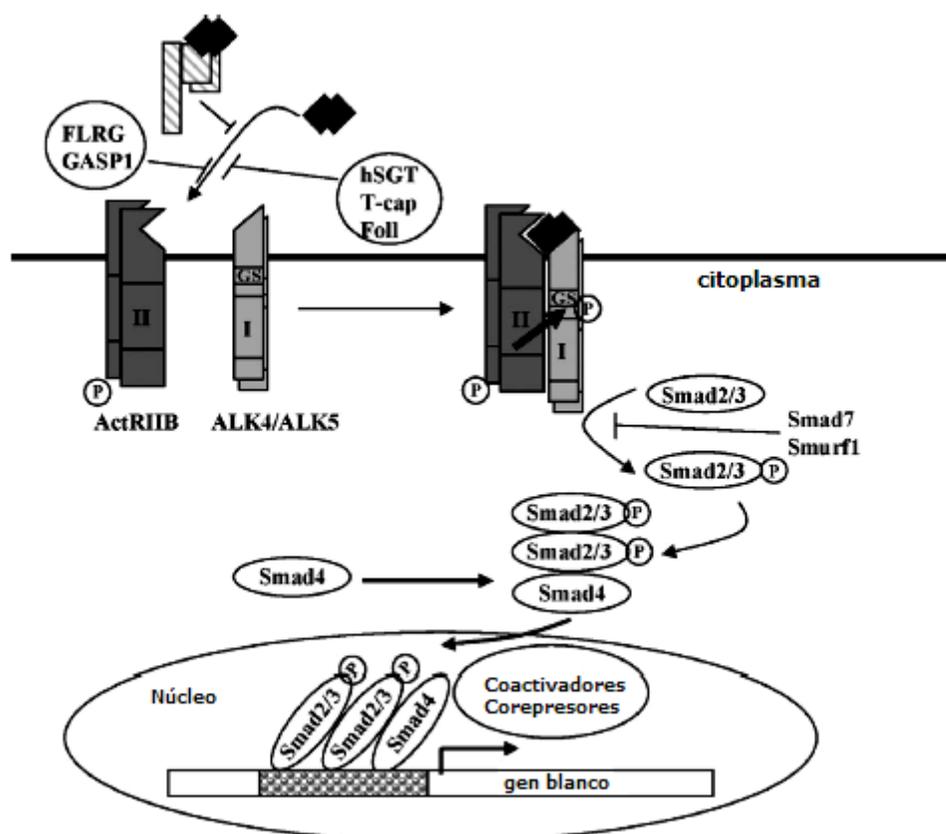
## **2.2. Regulación de la expresión del gen de la *miostatina***

La expresión del gen de la *miostatina* es regulada por procesos transcripcionales (Spiller *et al.*, 2002) y diferentes activadores de la *miostatina* han sido reportados. La proteína *MSTN* es primero sintetizada en su forma inactiva o latente de aproximadamente 376 aminoácidos,

que incluye una secuencia señal, un sitio proteolítico y en la región carboxilo terminal se encuentra una región altamente conservada de nueve residuos de cisteína y el ligando activo (McPherron *et al.*, 1997; Dominique y Gérard, 2006).

Esta proteína se encuentra en forma inactiva o latente cuando está ligada a proteínas inhibitoras de alto peso molecular (como la GASP-1, FLRG, hSGT, T-cap y la Foll), las cuales suelen unirse ya sea a la proteína madura o bien a la proteína junto con su propéptido (Hill *et al.*, 2002; Dominique y Gérard, 2006) que también actúa como un inhibidor (Fig. 1). Una vez activada, la *miostatina* forma dímeros y se une al receptor activina tipo II (ActRIIB) en la superficie celular, que según Lee y McPherron (2001) puede ser un activador *in vivo* de la *miostatina*. Una vez unida al receptor, éste activa al receptor activina tipo I (ActRIB) y se lleva a cabo la transfosforilación de ambos receptores por estimulación de la actividad de ALK4 o ALK5 (activin-like kinase) del ActRIB (Dominique y Gérard, 2006; Kollias y McDermott, 2008). Esto va a estimular por medio de una señal, la fosforilación de los factores de transcripción SMAD2 y SMAD3 que van a actuar como mediadores intracelulares de la señal de la *MSTN* formando un complejo con SMAD4 y así activar o reprimir la transcripción del gen blanco (Kollias y McDermot, 2008) (Fig. 1). Otros factores de transcripción SMAD actúan como inhibidores del complejo SMAD2/3/4. El SMAD7 y SMurf1 (SMAD-ubiquitin regulatory factor), actúan uniéndose a un dominio de los SMAD 2/3, impidiendo la formación del complejo y truncando la señal de la *MSTN* hacia el núcleo donde se llevaría a cabo la transcripción (Dominique y Gérard, 2006).

En general, la expresión de la *MSTN* se piensa que puede ser controlada a diferentes niveles y mediante diversos mecanismos, como por ejemplo algunos antagonicos, que llegan a interactuar con esta proteína e inhibir la activación de su receptor (Lee y McPherron, 2001; Hill *et al.*, 2002; Colussi *et al.*, 2008).

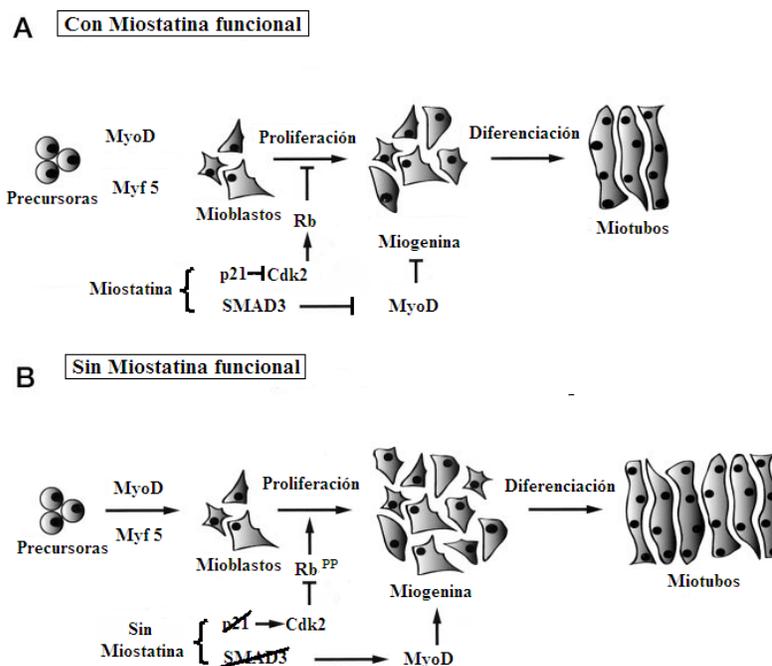


**Figura 1.** Factores involucrados en la regulación de la *miostatina* (tomado de Dominique y Gérard, 2006)

### 2.3. Mecanismo de acción de la *MSTN* en el control del crecimiento muscular

Thomas *et al.* (2000) propusieron un modelo de acción de la *MSTN* durante la miogénesis que posteriormente fue modificado por Langley *et al.* (2002). En dichos modelos mencionan que durante la miogénesis o crecimiento y diferenciación, la *MSTN* regula la proliferación de mioblastos y la diferenciación a miotubos para la formación de las fibras musculares (Hawke y Garry, 2001). En un primer modelo Thomas *et al.* (2000) menciona que la *MSTN* en su forma activa (Fig.2-A) reprime la proliferación de los mioblastos a través de la inducción de la sobre-expresión de la proteína p21, la cual a su vez inhibe a la Cdk2 (Ciclina dependiente de kinasa 2), resultando en la activación de la proteína Rb o

retinoblastoma (inhibidora de la proliferación celular), la cual se encuentra en un estado hipofosforilado, inhibiendo así la proliferación de los mioblastos durante la miogénesis ( $MSTN\uparrow > \uparrow p21 > \downarrow cdk2 > \uparrow Rb > \text{ciclo celular inhibido}$ ). Cuando la Cdk2 es inhibida, esta no forma un complejo con la ciclina E (Cdk2) requerido para la inactivación de la proteína Rb (retinoblastoma) por hiperfosforilación (McCroskery *et al.*, 2003). Si la *MSTN* no se encuentra en su forma activa (Fig. 2-B), el ciclo celular de los mioblastos no es inhibido y por lo tanto su proliferación ocurre ( $MSTN\downarrow > \downarrow p21 > \uparrow cdk2 > \downarrow Rb > \text{ciclo celular activado}$ ). Por otro lado Langley *et al.* (2002) adicionalmente al modelo anterior propusieron que en presencia de la *MSTN* (Fig. 2-A), el factor de transcripción Smad3 inhibe la expresión de MyoD (otro factor de transcripción que induce la expresión de la miogenina), deteniendo así la diferenciación miogénica (de mioblastos a miotubos) por la disminución en la expresión de la miogenina.



**Figura 2.** Modelo de acción de la *miostatina* sobre el crecimiento y diferenciación muscular (modificado de Thomas *et al.*, 2000 y Langley *et al.*, 2002).

## 2.4. Metabolismo y la *MSTN*

Estudios más recientes han encontrado que la *MSTN* participa no solamente en la regulación de los genes involucrados en el crecimiento muscular, sino también en el metabolismo energético del músculo y en el control de vías apoptóticas como un modulador de la supervivencia celular (Chelh *et al.*, 2009). Esto es, se ha asociado la sobre-expresión de la *MSTN* con la atrofia muscular y pérdida de masa corporal causada por glucocorticoides en condiciones catabólicas (Hasselgren, 1999; Lang *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2003), y se ha demostrado esta relación provocando una delección en la *MSTN*, lo cual resultó en evitar el efecto de esas hormonas (Gilson *et al.*, 2007).

Así mismo, se ha reportado que la regulación de la expresión de la *MSTN* es influenciada por el estatus nutricional de los organismos (González-Cadavid y Bhasin, 2004), ya que si estos están bajo restricción alimenticia o ayuno, los niveles de *MSTN* aumentan, observándose una simultánea disminución del crecimiento somático, principalmente del músculo, mientras que cuando hay una recuperación después del ayuno se puede observar una disminución en los niveles de la *MSTN* (González-Cadavid *et al.*, 1998; Terova *et al.*, 2006), al tiempo que se aprecia un crecimiento más rápido de lo normal (Rescan *et al.*, 2007). Sin embargo, también se han encontrado discrepancias con respecto a estas afirmaciones, en particular en cuanto a la duración de los efectos del ayuno y la expresión de la *miostatina*; Rodgers *et al.* (2003) encuentran que el ayuno prolongado en larvas de tilapia *Oreochromis mossambicus*, además de reducir el crecimiento somático, reduce los niveles de *MSTN*, mientras que cuando el ayuno es por periodos cortos, se puede observar una sobre-expresión de este gen. En otros estudios relacionados al estrés, se ha observado que la exposición prolongada a altas o bajas temperaturas inducen un incremento en la abundancia de transcritos de la *MSTN*, ya sea por incremento en los niveles de glucocorticoides (Lang *et al.*, 2001; Weber y Bosworth, 2005), o bien, por una activación de la *MSTN* en forma latente presumiblemente por metaloproteinasas (Wolfman *et al.*, 2003). Los resultados de los estudios anteriores demuestran que el estado metabólico de los

organismos tiene un efecto sobre la expresión de genes que regulan el crecimiento muscular, o específicamente de la *miostatina*.

## 2.5. El gen de la *miostatina* (*MSTN*) en invertebrados

Adicionalmente a encontrarse en vertebrados, ortólogos del gen de la *miostatina* (*MSTN*) también han sido caracterizados en varias especies de invertebrados, incluyendo pectínidos. En *A. irradians* se identificó una secuencia nucleotídica traducida de aproximadamente 382 aminoácidos del gen de la *MSTN* a partir de secuencias de ADNc (Kim *et al.*, 2004), donde observan que la región conservada de la proteína de 117 aminoácidos es 61% similar a las secuencias de varias especies de mamíferos, y la secuencia completa de la misma presenta una alta homología con la de otros invertebrados como *Ciona intestinalis* y la *mioglianina* en *Drosophila melanogaster*, el cual es un gen homólogo a la *miostatina*. Kim *et al.* (2004) al realizar un análisis cuantitativo de la expresión de la *MSTN* por la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) en diferentes tejidos de *A. irradians*, reportan que la mayor abundancia del transcrito de este gen es en el músculo aductor, y con menor aunque significativa abundancia, en el manto. Estos autores concluyen que es posible que la *MSTN* tenga una importante participación en el crecimiento del músculo y en el desarrollo de los moluscos bivalvos. Mas recientemente, Guo *et al.* (2009) identificaron un polimorfismo o SNP (por sus siglas en inglés: *Single Nucleotide Polymorphism*) en el segundo exón de la *miostatina* en esta misma especie, el cual evalúan actualmente para definir si este marcador puede ser utilizado en programas de selección asistida por marcadores moleculares (MAS, por sus siglas en inglés) para la mejora genética del tamaño del músculo aductor de *A. irradians*. La presencia de polimorfismos en el gen de la *miostatina* es adicionalmente importante en el contexto de observaciones previas en *A. ventricosus* tanto diploides como triploides (Ruíz-Verdugo *et al.*, 2001a), habiéndose observado que existe variación en el peso del músculo aductor entre familias de medios hermanos, indicando un componente genético en la determinación del tamaño del músculo. En *N. subnodosus* Petersen (2009) encontró evidencia recientemente de un posible loci de carácter cuantitativo (QTL por sus siglas en inglés) asociado al peso del músculo aductor, indicando la existencia de uno o

más genes con efectos mayores involucrados en determinar el crecimiento del músculo aductor, aunque el o los genes específicos asociados al QTL no han sido identificados aún. En *Chlamys farreri* ha sido identificado tanto el ARNm-ADNc como el gen completo de la *MSTN* (Zhang *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2010), encontrando que el gen exhibe una organización genómica como la ya caracterizada en vertebrados, esto es, de tres exones y dos intrones. Al igual que Kim *et al.* (2004), estos últimos autores encuentran que la mayor expresión de la *MSTN* ocurre en músculo. En un reciente estudio, Hu *et al.* (2010) analizan cuantitativamente los transcritos de este gen en diferentes estadios del desarrollo de la almeja *C. farreri*, encontrando que es en gástrula el estadio en el cual se observa la mayor expresión, y que al comparar la expresión en diferentes tejidos de almejas adultas, es en el músculo estriado (*vs.* el liso) donde se observó la mayor expresión de la *MSTN*, seguido del manto. En crustáceos, Covi *et al.* (2008) reportan la primera secuencia de la *MSTN* a partir de ARNm-ADNc del cangrejo *Gecarcinus lateralis*. El análisis de la secuencias indica que este gen es altamente conservado al compararlo con sus ortólogos en mamíferos. A diferencia de los análisis con pectínidos, al realizar el análisis cuantitativo por qPCR, Covi *et al.* (2008) observan que los transcritos del gen de la *MSTN* se encuentran en varios tejidos, siendo más abundante en el músculo esquelético y en el corazón. Adicionalmente concluyen que este gen tiene una importante participación en la regulación del crecimiento muscular principalmente en la intermuda, cuando el crecimiento del organismo está restringido por el exoesqueleto. Esto ha sido observado en estudios recientes en la langosta *Homarus americanus* por MacLea *et al.* (2010), en donde además de demostrar la ubicuidad de la expresión del gen de la *MSTN* en tejidos de esta especie, demuestran que este gen es regulado transcripcionalmente durante la muda. En esta especie se observa que durante la intermuda se ve incrementada la expresión de la *MSTN*, deteniendo el crecimiento del organismo y actuando como un inhibidor de la síntesis de proteínas, lo cual ha sido también observado en *G. lateralis* (Covi *et al.*, 2010). Contrariamente, durante la pre-muda en estas especies se ha observado una disminución significativa en la expresión de este gen regulador negativo, induciendo tal disminución al crecimiento del músculo esquelético principalmente. Aunque los primeros autores observaron un incremento en los niveles de ecdisteroides, no encuentran una relación entre estos y los niveles del transcrito

de la *MSTN*. Por otro lado, en el camarón *Pandalopsis japonica* (Kim, *et al.*, 2010) se ha observado que la ablación de un tallo ocular, lo cual resulta en la inducción de la muda, reduce la expresión de la *MSTN*, afirmando que hay una relación en la expresión de este gen con la intermuda. Adicionalmente mencionan que en esta especie el gen de la *MSTN* no se expresa igualmente o en la misma magnitud en todos los tejidos, y que además de tejidos musculares este gen se encontró expresado en tejidos no musculares como el ganglio torácico y las branquias.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* se han realizado esfuerzos para el desarrollo de triploides como una tecnología que busca principalmente incrementar su productividad en cultivo (Maldonado-Amparo *et al.*, 2004; Ibarra-Humphries, 2006). Se ha demostrado recientemente que el crecimiento muscular en triploides de esta especie es mayor que en diploides, y que esto ocurre independientemente de la maduración gonádica (Ramírez *et al.*, 2009). Así mismo, en términos relativos, el incremento en peso del músculo aductor en pectínidos triploides supera el incremento en peso del resto de la biomasa (Ruíz-Verdugo *et al.*, 2000 & 2001b; Ramírez *et al.*, 2009), indicando que la condición de triploidía tiene un efecto mayor hacia el crecimiento del músculo aductor. Tal crecimiento del músculo fue asociado a su vez con una hipertrofia de células musculares (Palacios *et al.*, 2004). Es importante ahora conocer si existen genes específicos involucrados en tal crecimiento diferencial e hipertrofia, en los cuales se vea alterada su expresión debido al incremento en el número cromosómico y dosis génica que conlleva la triploidía. Uno de los genes de mayor interés es el de la *MSTN* por su antes mencionado efecto sobre el crecimiento muscular en vertebrados e invertebrados, así como por su conocida regulación transcripcional a través de una cadena de genes efectores y supresores.

En este trabajo se propone evaluar si la expresión de la *miostatina* se ve alterada por los cambios genómicos (Osborn *et al.*, 2003; Adams y Wendel, 2005; Adams, 2007) que se producen por el incremento en número cromosómico y posiblemente en dosis génica global que ocurren durante la triploidización, y así conocer si este regulador negativo del crecimiento, el gen de la *miostatina* está relacionado con el crecimiento diferencial que presentan los organismos triploides sobre los diploides cuando ambos son crecidos bajo condiciones ambientales específicas que permiten la expresión diferencial del crecimiento, esto es, bajo condiciones ambientales de temperaturas de verano y baja productividad

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Caracterizar parcialmente el transcrito del gen de la *miostatina* (*MSTN*) en la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* y conocer si este gen puede ser asociado con las diferencias en crecimiento muscular entre diploides y triploides.

### 4.2. Objetivos específicos

- 1.- Caracterizar parcialmente el transcrito del gen de la *MSTN* en músculo aductor en diploides.
- 2.- Delimitar en músculo aductor las células donde se expresa el transcrito de la *MSTN* en diploides y triploides
3. Comparar la expresión del gen de la *MSTN* entre diploides y triploides en diferentes etapas del crecimiento
4. Comparar la expresión del gen de la *MSTN* en diferentes tejidos de diploides y triploides
5. Cuantificar el tamaño y número de fibras musculares
6. Cuantificar la acumulación de componentes de reserva en el músculo aductor de organismos diploides y triploides

## 5. HIPÓTESIS

Si hay una subexpresión del gen de la *miostatina* en triploides de la almeja *N. subnodosus*, ésta se asociará al incremento en el número y tamaño de las fibras musculares.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Origen de Grupos Experimentales

Los grupos experimentales de almeja *Nodipecten subnodosus* utilizados en este trabajo de investigación se derivaron de los producidos y reportados por Ramírez-Arce (2009), en donde se realizaron los estudios comparativos de crecimiento y desarrollo gonádico entre almejas diploides y triploides crecidas en Ligüi, Bahía de Loreto, Baja California Sur. A continuación se describe la metodología de Ramírez-Arce (2009) para la conformación de esos grupos y las evaluaciones biométricas e histológicas realizadas que son pertinentes para el presente.

Para la producción de los organismos que conforman los grupos experimentales diploides y triploides se colectaron 30 reproductores silvestres en la Bahía de Loreto, Baja California Sur que fueron trasladados al laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola del CIBNOR. Se acondicionaron para el desove durante 15 días (Ramírez *et al.*, 1999) y posteriormente se indujeron al desove de manera individual mediante una inyección de serotonina (0.5 µl [0.5mM]) en el músculo aductor (Ramírez-Arce, 2009). Se obtuvieron ovocitos de cinco organismos diferentes, colocándolos individualmente en vasos de precipitado de 1 L y fertilizándolos con un *pool* de esperma obtenido de otros tres individuos que fueron utilizados únicamente como machos. De cada grupo de ovocitos el 50% se utilizó para la conformación del grupo control diploide y el resto para el grupo de los organismos triploides. La inducción a la triploidía se realizó posterior a la fertilización adicionando 0.75 mg L<sup>-1</sup> de citocalacina-B para inhibir la extrusión del segundo cuerpo polar, iniciando el tratamiento cuando 50% de los ovocitos en el grupo control presentaron el primer cuerpo polar y terminándolo cuando 50% presentaron el segundo cuerpo polar, utilizando el protocolo ya establecido para la almeja mano de león en el Laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola (Ruíz-Verdugo *et al.*, 2000,2001a; Maldonado-Amparo *et al.*, 2004; Ibarra-Humphries y Ramírez-Arce, 2008).

Los embriones obtenidos de los grupos controles y de los inducidos a la triploidía se mantuvieron de forma individual por 24 h, hasta el estadio veliger (larva D). En los desoves

inducidos a la triploidía el porcentaje de éxito obtenido fue evaluado por citometría de flujo utilizando un analizador de ploidía (PARTEC PA-III, Alemania) y siguiendo la metodología establecida por Allen (1983). De los cinco desoves, tres presentaron un 80% de triploidía y dos menor a esto por lo que fueron descartados. Las larvas D de los tres desoves con 80% de larva triploide, y la larva D obtenida de los controles diploides no tratados, fueron retenidas para conformar los grupos experimentales diploides y triploides, mezclando dentro de cada grupo las larvas obtenidas de los diferentes desoves y manteniendo cada grupo de ploidía por separado.

El cultivo larvario de los dos grupos experimentales se llevó a cabo de forma separada en tanques de 500 L con una densidad inicial de 5 larvas  $\text{ml}^{-1}$ . Se alimentaron con una relación 1:1 de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* ( $1.5 \times 10^9$  células organismo $^{-1}$  día $^{-1}$ ), se mantuvieron a una temperatura de 24° C y se realizó recambio total de agua cada 48 h hasta que el 50% de las larvas alcanzaron el estadio pediveliger (larva con mancha ocular), cuando ocurre su asentamiento o fijación a un sustrato. Al llegar a este estadio las larvas de cada grupo fueron colocadas en tanques de fondo cónico de 80 L, cada uno con un sustrato de malla plástica con luz de malla de 3 mm para la fijación de la larva, utilizando tres tanques por grupo experimental a una densidad de 1 individuo por  $\text{ml}^{-1}$ . El cultivo en este estadio fue de 45 días hasta la talla de 2 mm de longitud. Al concluir la etapa de preengorda se realizó un análisis individual de la triploidía por citometría en 30 semillas del grupo triploide, obteniendo un 30% de triploides. La semilla fue desgranada de los sistemas de fijación y colocadas en bolsas con luz de malla de 1 mm, con una densidad de aproximadamente 1000 individuos por bolsa. Las semillas en bolsa fueron transportadas y colocadas dentro de canastas ostrícolas en un sistema de suspensión durante 60 días en Puerto Escondido, cercano a Ligüi en el Parque Nacional Bahía de Loreto en diciembre de 2007. La semilla se recambió a bolsas con luz de malla de 2 mm posteriormente y cuando alcanzó la talla de 1.5 cm a principios de abril del 2008, fue colocada en canastas ostrícolas (edad de 0 días de cultivo). La densidad inicial por canasta (55 cm de longitud, 55 cm de altura y 7.5 cm de profundidad, con un área de 0.3  $\text{m}^2$ ) fue de 400 organismos, con un total de cuatro canastas para el grupo triploide y diez para el grupo control diploide. En mayo de 2008, a los 36 días de cultivo se formaron tres réplicas por grupo (1 módulo por réplica),

cada uno con cinco canastas ostrícolas con 230 organismos cada una, y se dio inicio a las evaluaciones de crecimiento durante la engorda. Los organismos fueron mantenidos en suspensión durante los 476 días de cultivo, ajustando las densidades periódicamente acorde al crecimiento, y manteniéndolas iguales para los grupos experimentales (diploides y triploides). El crecimiento fue evaluado en intervalos de 45 a 60 días.

En cada muestreo de Ramírez-Arce (2009) se tomaron al azar 30 organismos por réplica (módulo) tanto del grupo triploide como del diploide, con un total de 90 organismos por grupo experimental. Los organismos fueron trasladados al Laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola del CIBNOR donde fueron evaluados para determinar variables de crecimiento tanto en concha (longitud), peso total (tejidos y concha), peso de biomasa (tejidos) y peso del músculo aductor. La verificación de la triploidía se realizó por citometría de flujo, utilizando una muestra del manto ( $0.25 \text{ cm}^2$ ) de cada organismo muestreado del grupo triploide y una muestra al azar de 10 organismos de cada réplica del grupo diploide, preservadas a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su verificación de la ploidía individual (Maldonado-Amparo *et al.*, 2004, p188). Sólo aquellos individuos verificados como triploides fueron utilizados para todos los análisis subsecuentes tanto en Ramírez-Arce (2009) como en este trabajo. Se estimaron también los índices relativos de músculo (IM) y la gónada (IG), tamaño de concha (ancho y convexidad), peso de biomasa y de músculo aductor, incrementos en peso de biomasa y músculo entre meses de evaluación, estadios de desarrollo gonádico y el grado de esterilidad en triploides. Estas variables serán presentadas en la discusión con fines de interpretación de los resultados obtenidos en expresión génica de la *miostatina*, hipertrofia e hiperplasia, y componentes bioquímicos en músculo. Adicionalmente se evaluaron mensualmente por análisis de imágenes satelitales las variables ambientales de temperatura y la concentración de clorofila-*a* (Ramírez-Arce, 2009).

## 6.2. Muestreo de Tejidos

### 6.2.1. Tejidos para análisis de expresión génica de la *miostatina*

Músculo aductor: en paralelo a los muestreos de Ramírez-Arce (2009) se realizaron muestreos de tejido muscular de organismos al azar en Dic-08 (a los 231 d de cultivo), Feb-09 (282 d), Abr-09 (351 d), Jun-09 (406 d) y Ago-09 (476 d), tomando una muestra (~200 mg) de cada una de 15 almejas dentro del grupo diploide y 30 almejas del grupo triploide en cada fecha de muestreo. Los tejidos fueron preservados en *RNAlater* (Ambion), mantenidos a 4 °C por 24 h, y almacenados a -20 °C hasta la verificación de la ploidía por citometría de flujo. Para los análisis cuantitativos por *qPCR* se utilizaron ocho organismos triploides y ocho diploides de cada una de las fechas muestreadas, todos verificados en su ploidía por citometría de flujo.

Manto, gónada, glándula digestiva, branquia y músculo aductor: En el último muestreo en Ago-09, a los 476 d de cultivo, se obtuvo adicionalmente una muestra de ~200 mg de cinco tejidos: manto, gónada, glándula digestiva, branquia y músculo aductor de cinco organismos diploides y de cinco triploides verificados por citometría antes de sacrificarlos, utilizando una muestra de hemolinfa extraída del músculo aductor con una jeringa. Se preservaron en *RNAlater* (Ambion), se mantuvieron a 4 °C por 24 h, y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis cuantitativo por *qPCR*.

### 6.2.2. Tejidos para análisis de hibridación *in situ* e histoquímica

En los muestreos de Jun-09 y Ago-09, cuando los organismos tenían 406 d y 476 d en cultivo, se obtuvo un corte transversal del músculo aductor de 10 organismos diploides y de todos los organismos del grupo experimental triploide. Posteriormente a la verificación de la triploidía, se retuvieron los tejidos muestreados y preservados de 15 organismos verificados como triploides del muestreo en Jun-09 (406 d en cultivo) y 20 organismos verificados del muestreo en Ago-09 (476 d). El corte transversal del músculo aductor de cada individuo fue colocado en un casete para histología, preservado en paraformaldehído al 4% (Anexo I) en PBS (Anexo II) durante 48 h, recambiando a las 24 h.

Se utilizó la técnica histológica convencional (Humason, 1979) que consiste en la deshidratación del tejido sumergiéndolo en una serie de alcoholes a concentraciones crecientes preparados con H<sub>2</sub>O tratada con DEPC (Invitrogen) y la inclusión del mismo en parafina nueva y utilizada en forma exclusiva para estas muestras. Los procesos específicos utilizados para la hibridación *in situ* y la histoquímica se describen más adelante.

### **6.3. Aislamiento, Hibridación *in situ*, y Análisis de Expresión de la *Miostatina***

#### **6.3.1. Caracterización del transcrito del gen de la *miostatina* (*MSTN*) en *Nodipecten subnodosus***

ARN total fue obtenido del músculo aductor de cuatro almejas, tres de la población cultivada de Bahía de Loreto y una proveniente originalmente de la población de Ojo de Liebre, y en cultivo en Bahía Tortugas, ambos sitios en Baja California Sur.

##### **6.3.1.1. Diseño de Cebadores (*primers*)**

Se diseñaron cebadores redundantes y específicos utilizando tanto el programa Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000; <http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) como el programa Oligo Analyzer v.3.1 de Integrated DNA Technologies, Inc. (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) buscando regiones altamente conservadas del gen de la *miostatina* (*MSTN*) en dos especies de pectínidos: *Chlamys farreri* (GenBank EU563852.1 y DQ988329.2) y *Argopecten irradians* (GenBank AY553362.1) y una en de vertebrados, *Gallus gallus* (GenBank AF346599.2).

Los diferentes cebadores obtenidos fueron evaluados por PCR para establecer su eficiencia de amplificación del gen de la *MSTN* en *N. subnodosus*, seleccionando los cebadores enlistados en la Tabla I. Los cebadores M13 forward y reverse fueron utilizados para la identificación de las clonas obtenidas.

**Tabla I.** Cebadores utilizados para el aislamiento y clonación del gen de la *MSTN* en *Nodipecten subnodosus*.

Cebador	Secuencia	T <sub>m</sub> (°C)
<i>MSTN</i> -F	5'-ACGAGAAATCGGMAGAAGA-3'	56.3
<i>MSTN</i> -R	5'-CAATCGCGTCAATGCTATGTT-3'	64.7
M13- F	5'-GTAAAACGACGACGGCCAG-3'	57.6
M13-R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	50.6

**F**=forward; **R**=reverse; **T<sub>m</sub>** = *melting temperature* = temperatura de fusión; **M**=A o C

#### 6.3.1.2. Caracterización parcial del transcrito del gen de la *MSTN* en *Nodipecten subnodosus*

Extracción de ARN: se realizó la extracción en los cuatro organismos diploides utilizando *TriPure Isolation Reagent* (Roche Applied Science) siguiendo el procedimiento recomendado por el proveedor (Anexo III), resuspendiendo en 30 µl de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC (Invitrogen). Se cuantificó la concentración del ARN obtenido de cada individuo utilizando un espectrofluorómetro (Thermo Scientific NanoDrop 1000). Se eliminó el ADN genómico presente en cada muestra utilizando *DNasa I* (RQ1 DNase, Promega) siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. El ADN complementario (ADNc) fue sintetizado a partir de 5 µl del ARN obtenido de cada organismo siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante del *kit Improm II Reverse Transcription System* (Promega) (Anexo IV).

Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa en punto final (PCR): los cebadores *MSTN*-F (forward) y *MSTN*-R (reverse), fueron utilizados para la amplificación del transcrito del gen de la *MSTN* en un termociclador (Applied Biosystems Thermal Cycler 2720). Se utilizó un volumen total de 12.5 µl, conteniendo 0.2 U de Taq Platinum, 1X de buffer para PCR, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µM de dNTP's (Invitrogen), 0.48 µM de cebador F y cebador R y 2 µl del ADNc de cada una de las muestras. Las condiciones para la amplificación fueron de 4 min a 94° C seguido de 35 ciclos, cada uno de 30 s a 94° C, 30 s a 60° C y 45 s a 72° C (desnaturalización / alineación / extensión), con una extensión final

de 10 min a 72° C. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis horizontal en un gel de agarosa (Invitrogen) al 1% en TBE 1X (100 volts; 90 A; 30 min), teñido con Bromuro de Etidio (EtBr), utilizando un marcador de tamaños de 100 a 1500 pb (100 bp DNA ladder, Invitrogen) junto con los productos de PCR para identificar el fragmento por su tamaño. Estos fueron visualizados en un transiluminador con luz UV (BioDoc-It Imaging System, UVP BioImaging Systems).

Ligación-Transformación: los fragmentos obtenidos (~572 pb) de la reacción de PCR de cada muestra fueron ligados y clonados utilizando el vector plasmídico TOPO TA Cloning (Invitrogen) (Anexo V-a), y transformados en bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) (Anexo VI-a), crecidas durante ~18 h en medio LB-Agar con ampicilina. De cada colonia levantada (Anexo VI-b) se realizó la amplificación por PCR utilizando los cebadores M13-F (forward) y M13-R (reverse) en el mismo termociclador (Applied Biosystems Thermal Cycler 2720), utilizando las mismas concentraciones de amplificación mencionadas antes a excepción de la concentración 0.1 U de Taq Platinum y de los cebadores M13: 0.2  $\mu$ M de cebador F y de cebador R. Las condiciones de amplificación fueron: 4 min a 95° C seguido de 30 ciclos de: 30 s a 94° C, 30 s a 50 °C y 45 s a 72 °C (desnaturalización / alineación / extensión), con una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis horizontal en un gel de agarosa como se describió anteriormente.

Secuenciación-Identificación: de las colonias amplificadas se obtuvieron siete clonas que presentaron un fragmento > 700 pb (cuatro de los organismos BL-2 y BL-3 de Loreto y tres del organismo BT-1 de Bahía Tortugas). Estas fueron nuevamente amplificadas con los cebadores M13-F (forward) y M13-R (reverse), aumentando el volumen total de reacción de PCR a 25  $\mu$ l para su posterior secuenciación. La secuenciación se realizó en ambos sentidos (5'-3' y 3'-5') por MACROGEN (Corp. Korea). Se utilizó el programa BioEdit v7.0.9 (Hall, 1999) para la edición de las secuencias obtenidas, y el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para análisis de la similitud (Altschul *et al.*, 1997; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) con otras secuencias nucleotídicas y de aminoácidos (blastn y blastp) del gen de la *MSTN* ya existentes en la base de datos de la NCBI (National Center

for Biotechnology Information), en el sitio de internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>. A partir de la secuencia obtenida, se realizó la traducción conceptual con el programa en línea *DNA to protein translation* en el sitio de internet <http://insilico.ehu.es/translate/>. Con la secuencia de aminoácidos se realizó una búsqueda de dominios en *Conserved Domains* Marchler-Bauer *et al.* (2008) en el sitio de internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>.

### 6.3.2. Localización del transcrito de la *miostatina* (*MSTN*) en músculo aductor de *Nodipecten subnodosus* por hibridación *in situ*

Se utilizó la metodología descrita en Sifuentes-Romero *et al.* (2010).

#### 6.3.2.1. *Generación de sonda de hibridación para la MSTN*

*Obtención de ARN – ADNc*: se extrajo el ARN total de cuatro organismos diploides de los obtenidos en los muestreos de Bahía de Loreto, utilizando *TriPure Isolation Reagent* (Roche Applied Science) siguiendo el procedimiento recomendado por el proveedor (Anexo III), en un volumen final de 50 µl. Se digirió el ARN obtenido de cada organismo consecutivamente dos veces usando DNAsa I (RQ1 DNase, Promega) y realizando una purificación con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1) (Anexo VIII) para la completa eliminación del ADN genómico presente. La síntesis de ADN complementario (ADNc) se obtuvo a partir de 5 µl tomados individualmente de cada muestra de ARN obtenida, utilizando el sistema de transcripción reversa *Improm II Reverse Transcription System* (Promega), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Anexo IV).

*Amplificación por PCR*: Se utilizó un termociclador PCR Sprint Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation) para la amplificación del ADNc de cada organismo con los cebadores *MSTNc-F* (forward) y *qMST-R* (reverse), a un volumen total de 12.5 µl, conteniendo 0.5 U de GoTaq DNA Polymerase (Promega), 1X Green GoTaq Reaction Buffer, 1.32 mM de PCR Nucleotide Mix (Promega), 0.43 µM de cebador F y cebador R, 1 µl de ADNc y H<sub>2</sub>O tratada con DEPC. Las condiciones de amplificación fueron: 2 min a

94° C seguido de 35 ciclos, cada uno de 1 min a 94° C, 1 min a 64° C y 1 min a 72° C (desnaturalización / alineación / extensión). Se utilizaron 2.5 µl de cada amplificación para la electroforesis y su visualización en un gel de agarosa al 2% en TAE 1X, teñido con EtBr y visualizados en un transiluminador con luz UV (EC3 Imaging System, UVP BioImaging Systems). Para identificar el tamaño del fragmento deseado (~ 560 pb) se corrió una escalera-marcador de tamaños 72 a 1,353 pb (TrackIt™ phiX174RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen). Las condiciones eléctricas y de tiempo para la electroforesis fueron de 80 volts; 90 A; 30 min. El fragmento obtenido de ~ 560 pb de cada amplificación fue colocado en un solo tubo para obtener un volumen de ~ 40 µl. La purificación de los fragmentos se realizó utilizando el *Kit Wizard SV Gel & PCR Clean-up System* (Promega) (Anexo IX) y su verificación se hizo por electroforesis utilizando 5 µl del producto de PCR amplificado en un gel de agarosa al 2% en TAE 1X.

Ligación-Transformación: el producto de PCR purificado se ligó siguiendo las indicaciones del proveedor utilizando *pGEM-T Easy Vector* (Promega) (Anexo V-b) y almacenó a -20 °C toda la noche. Aproximadamente 12 h después, se realizó la transformación en bacterias competentes *E. coli* (Anexo XI-a), e incubó en agitación durante la noche a 37 °C. Las colonias fueron levantadas (Anexo XI-b) aproximadamente 20 h después de iniciar la incubación, creciéndolas a 37 °C en agitación, en medio LB por toda una noche.

Secuenciación-Identificación: la purificación del plásmido se realizó por el método de lisis alcalina (Anexo XII) y posteriormente linearizando el plásmido con una digestión enzimática con *Eco* RI (Anexo VII), y verificados en un gel de agarosa utilizando 5 µl de cada reacción. Los plásmidos con el inserto (clonas 1, 2, 3 y 5, de 6 en total) se secuenciaron en ambas direcciones (5'-3' y 3'-5') para establecer la orientación de las mismas utilizando el equipo LI-COR IR<sup>2</sup> Sequencing System (LI-COR Biosciences) en el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo, A. C., Unidad Mazatlán. Las secuencias se analizaron con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para establecer la similitud (Altschul *et al.*, 1997; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) con otras secuencias del gen de la *MSTN* ya existentes en la

base de datos de la NCBI. De las secuencias analizadas, la clona número dos del organismo BT-1 presentó un mayor porcentaje de similitud con las secuencias existentes de la *MSTN* en otros pectínidos, por lo que fue seleccionada para los análisis subsecuentes. Con el plásmido purificado, se realizaron dos digestiones, cada una con las enzimas de restricción *ApaI* y *PstI* (Anexo X) para obtener fragmentos con sitios de iniciación de transcripción de la Polimerasa *SP6* y *T7* respectivamente, permitiendo el marcaje de las ribosondas de hibridación sentido y antisentido. Los fragmentos linearizados de ~4000 pb de cada digestión fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X con un marcador de 125 a 23,130 pb (Lambda DNA/HindIII Markers, Promega) corroborando la digestiones realizadas. De los fragmentos obtenidos de cada digestión (*ApaI* y *PstI*) se cortaron cada una de las bandas del gel, purificándolas con el *Kit Wizard SV Gel & PCR Clean-up System* (Anexo IX), y verificando la purificación de las digestiones realizadas por electroforesis utilizando 5 µl de cada purificación en un gel de agarosa al 2% en TAE 1X.

Sondas de hibridación: se generaron ribosondas por transcripción *in vitro* a partir de los plásmidos linearizados con las enzimas *PstI* y *ApaI*, utilizando *T7* y *SP6* RNA polimerasas. Estas fueron marcadas con digoxigenina, siguiendo la metodología descrita en Sifuentes-Romero *et al.* (2010), (Anexo XIII) utilizando el sistema DIG RNA Labeling (*SP6/T7*) (Roche Applied Science).

#### 6.3.2.2. *Hibridación y detección*

Cortes histológicos: Se utilizó la porción transversal del músculo aductor de los muestreos en Jun-09 (406d de cultivo) y Ago-09 (476d), que fueron preservados en paraformaldehído al 4% en PBS y procesados histológicamente. Se obtuvieron cortes de 4 µm con un microtomo rotatorio (Leica RM 2155, Leica Microsystems), montados en laminillas tratadas con Poly L-lisina (Sigma-Aldrich) utilizando un protocolo modificado de Hu (2004) ([http://hugroup.cems.umn.edu/Protocols/preparing\\_slides.pdf](http://hugroup.cems.umn.edu/Protocols/preparing_slides.pdf)) (Anexo XIV) y almacenadas a 4°C hasta su uso.

Hibridación in situ: La hibridación se llevó a cabo siguiendo la metodología de Sifuentes-Romero *et al.* (2010). Las laminillas se desparafinaron en xilol y rehidrataron en una serie de alcoholes a concentraciones decrecientes, hasta llegar a H<sub>2</sub>O tratada con DEPC, se enjuagaron con PBS preparado con H<sub>2</sub>O tratada con DEPC, fueron tratadas con proteinasa-K y posfijadas con paraformaldehído al 4% en PBS. Justo antes de la hibridación, las laminillas fueron deshidratadas en alcoholes a concentraciones crecientes hasta llegar a etanol al 100% (Anexo XVII).

La hibridación (Anexo XVIII) se realizó distribuyendo de manera homogénea a cada laminilla (cada tejido por replicado, 1 laminilla por sonda) 5 µl de cada sonda, sentido y antisentido, diluida en ~70 µl de solución de hibridación, y colocando las laminillas en una cámara húmeda a 42°C durante toda la noche. A las ~14 hrs, las laminillas fueron lavadas e incubadas con solución de bloqueo a temperatura ambiente (Anexo XIX), se incubaron con anticuerpo anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina, seguido del sustrato NBT/BCIP (sustrato de fosfatasa alcalina) como solución de revelado y finalmente lavadas con H<sub>2</sub>O destilada estéril. Se realizó la contra-tinción con eosina-fucsina por 30 s antes de montarlas con resina. Las laminillas fueron observadas al microscopio y documentadas mediante fotografía digital con el programa Image Pro Plus v.4.5 (Media Cybernetics, Inc). La preparación de las soluciones stock se detalla en el Anexo XV y las soluciones de trabajo el Anexo XVI.

### 6.3.3. Análisis de la expresión del gen de la *miostatina* (*MSTN*) por qPCR en tiempo real

#### 6.3.3.1. *Diseño de cebadores para el gen de la miostatina (MSTN) y genes constitutivos de referencia*

Se diseñaron cebadores para qPCR a partir de la secuencia obtenida del gen de la *miostatina* (*MSTN*) en *N. subnodosus* mediante el programa Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000) (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>), con una temperatura de fusión de 64°C, verificando la ausencia de dímeros en la secuencia mediante el programa Oligo Analyzer v.3.1 de Integrated DNA Technologies, Inc. (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>). Los cebadores para los genes constitutivos (de referencia) se diseñaron con

base en regiones altamente conservadas de los genes que codifican para la riboproteína L8 (rpL8) y la  $\beta$ -Actina utilizando secuencias obtenidas de la base de datos del GenBank (Benson *et al.*, 2004; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Las secuencias utilizadas para la rpL8 fueron las del lepidóptero *Antheraea pernyi* (EU541491), el crustáceo peneido *Litopenaeus vannamei* (DQ316258.1), el bivalvo ostréido *Crassostrea gigas* (AJ563478.1) y los bivalvos pectínidos *Argopecten irradians* (CB416772.1) y *Chlamys farreri* (AF526246.1). Las secuencias del gen  $\beta$ -Actina utilizadas fueron del pectínido *Mizuhopecten yessoensis* (DQ787858.1) y del ostréido *Crassostrea ariakensis* (EU234531.1). Todos los cebadores fueron sintetizados por Sigma Genosys (Sigma-Aldrich). Para confirmar la especificidad de cada uno de ellos, se realizaron PCR de punto final con un set de muestras seleccionadas al azar, visualizando los amplicones en un gel de agarosa al 2%. Las secuencias de los cebadores finalmente seleccionados se presentan en la Tabla II.

**Tabla II.** Secuencias de los cebadores diseñados para el análisis de expresión del gen de la *MSTN* y los genes constitutivos de referencia en *Nodipecten subnodosus* (*MSTN*=miostatina; RPL8=riboproteína L8;  $\beta$ Act= $\beta$ Actina)

Cebador	Secuencia	Tm (°C)
q <i>MSTN</i> 2-F	5'-CGGCGAATGTAAAGGTGAAC-3'	64.2
q <i>MSTN</i> 1-R	5'-TGTTTCGAGTTGTGGTCGAAG-3'	63.9
qRPL8.1-F	5'-CGTCATGGATACATCAAGGGT-3'	63.5
qRPL8.1-R	5'-CAAACAGTCCAGTGTACATGCC-3'	64.3
q $\beta$ Act-F	5'-CAGAGCAAGAGAGGTATCCTCACC-3'	66.2
q $\beta$ Act-R	5'-GTTGAAGGTCTCGAACATGATCTG-3'	65.8

**F**=forward; **R**=reverse; **Tm** = *melting temperature* = temperatura de fusión

6.3.3.2. *Caracterización cualitativa por PCR punto final, estandarización de la reacción por PCR cuantitativo (qPCR) y análisis de los genes de referencia*

Obtención de ARN – ADNc: se extrajo el ARN total del músculo aductor (ocho diploides y ocho triploides de cada una de las cinco fechas de muestreo), y del manto, gónada y branquia (cinco diploides y cinco triploides del muestreo en Ago-09 o a los 476 d de cultivo) utilizando TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science) siguiendo el procedimiento recomendado por el proveedor, en un volumen final de 50 µl (Anexo III). El ARN obtenido fue digerido dos veces con DNAsa I (RQ1 DNase, Promega) para la completa eliminación de ADN genómico (Anexo VIII), resuspendiendo el ARN purificado en 50 µl de H<sub>2</sub>O DEPC. Con el protocolo anterior no se logró la obtención de ARN de las muestras de glándula digestiva (cinco diploides y cinco triploides del muestreo en Ago-09 o a los 476 d de cultivo), por lo que su extracción se realizó utilizando el kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega) siguiendo las indicaciones del proveedor (Anexo XX). El ARN obtenido fue digerido y resuspendido como antes mencionado para los otros tejidos. Del ARN obtenido de cada muestra y todos los tejidos se tomaron 5 µl para la síntesis de ADN complementario (ADNc) utilizando el sistema de transcripción reversa *Improm II Reverse Transcription System* (Promega) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Anexo IV).

Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa en punto final (PCR): La verificación de la integridad del ADNc y caracterización cualitativa de las amplificaciones, se realizó amplificando por PCR de punto final todas las muestras con los cebadores de los genes constitutivos de referencia para los análisis de expresión en tiempo real, el gen  $\beta$ -Actina (q $\beta$ Act-F y q $\beta$ Act-R) y la riboproteína L8 (qRPL8.1-F y qRPL8.1-R), así como el gen de la *MSTN* (q*MSTN*2-F y q*MSTN*1-R) (Tabla I). El volumen total utilizado en las amplificaciones fue de 12.5 µl, adicionando 0.5 U de GoTaq DNA Polymerase (Promega), 1X Green GoTaq Reaction Buffer, 1.32 mM de PCR Nucleotide Mix (Promega), 0.43 µM de cebador F y cebador R, 1 µl de ADNc y H<sub>2</sub>O tratada con DEPC. Las condiciones de amplificación fueron: 2 min a 94° C seguido de 35 ciclos de: 1 min a 94° C, 1 min a 64° C y 1 min a 72° C (desnaturalización / alineación / extensión). Se utilizaron 2.5 µl de cada

amplificación para la electroforesis y visualización de los amplicones en un gel de agarosa al 2%.

Estandarización de amplificación por PCR cuantitativo (qPCR) y curva estándar: La estandarización de amplificación por qPCR para generar una curva estándar para el análisis de expresión de cada gen se realizó amplificando diluciones seriales de ADNc de una muestra de músculo aductor para cada gen (para *MSTN* de 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000; para la riboproteína L8 de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000; y para la  $\beta$ -Actina de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000). Para cada gen y sus diluciones, se evaluaron dos réplicas por amplificación de qPCR en un termociclador de tiempo real (Smart Cycler 2.0d, Cepheid), con concentraciones de reacción de: 1x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN), 1.6  $\mu$ M de cebadores (forward y reverse), 1  $\mu$ l de ADNc y H<sub>2</sub>O libre de RNAsas en un volumen final de 25  $\mu$ l. Las condiciones de amplificación por qPCR fueron: 15 min a 95° C seguido de 40 ciclos de: 30 s a 95° C, 30 s a 60° C y 30 s a 72° C (desnaturalización / alineación / extensión).

Análisis de los genes de referencia. Los valores de C<sub>q</sub> fueron analizados con el programa *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002) para determinar el gen de referencia más estable.

#### 6.3.3.3. *Cuantificación de la expresión del gen de la miostatina (MSTN) en músculo, manto, gónada, glándula digestiva y branquia de organismos diploides y triploides*

El análisis cuantitativo de la expresión de la *MSTN* se realizó individualmente en cinco organismos diploides y cinco triploides muestreados en el mes de Ago-09 (476 d de cultivo), evaluando la expresión génica en músculo aductor, manto, glándula digestiva, branquia y gónada. De cada individuo y tejido se analizaron dos réplicas por qPCR para cada gen (*MSTN*, rpL8 y  $\beta$ -Actina) utilizando las mismas condiciones de qPCR y volumen de reacción utilizados en la obtención de la curva estándar para cada gen.

Se estimó el valor de expresión génica de la *MSTN* por medio del método de ciclo umbral comparativo o C<sub>q</sub> comparativo (del inglés *quantification cycle*), utilizando los valores de expresión del gen  $\beta$ -Actina como gen de referencia para la normalización de la

expresión del gen de la *MSTN* de acuerdo a Vandesompele *et al.* (2002). Los valores de expresión relativa ( $\Delta Cq$ ) obtenidos para el gen de la *MSTN* a partir de la  $\beta$ -Actina, se linealizaron con la ecuación ( $2^{-\Delta Cq}$ ) propuesta por Livak & Schmittgen (2001). Para conocer las diferencias entre ploidías, los datos obtenidos por tejido en cada mes fueron analizados con el programa *Statistica v 6.1* (StatSoft, Inc.), utilizando primero un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (ploidía y tejidos), anidando a los individuos dentro de ploidía con fines de separar y estimar el efecto de variación observada entre individuos en análisis preliminares de la expresión del gen de la *MSTN*. El modelo lineal y anidado utilizado para cada tejido (músculo aductor, manto, glándula digestiva, branquia y gónada) fue:

(1)

$$Y_{ijk} = P_i + I_j(P_i) + e_{(ij)k}$$

En donde:

$Y_{ijk}$  = expresión relativa ( $2^{-\Delta Cq}$ ) de la *miostatina* dentro de cada ploidía  $i$ , considerando el efecto de los individuos dentro de cada ploidía, y estimada independientemente para cada tejido.

$P_i$  = efecto fijo de la ploidía  $i$ , en donde  $i=1, 2$  (diploide, triploide) en la expresión relativa de la *miostatina* para cada uno de los tejidos evaluados.

$I_j$  = efecto aleatorio del individuo  $j$ , en donde  $j=1, \dots, 8$  (el número de individuos diploides o el número de individuos triploides) evaluados para la expresión relativa de la *miostatina*.

$e_{(ij)k}$  = error causado por las variaciones aleatorias en la expresión relativa de las pseudoréplicas (2) evaluadas para cada individuo dentro de cada ploidía.

Adicionalmente se llevó a cabo un análisis completo anidado, incluyendo como factores a los ‘tejidos’, a las ‘ploidías’ anidadas dentro de ‘tejidos’, y a los ‘individuos’ anidados en la interacción entre tejidos y ploidías para conocer si existían diferencias entre tejidos y ploidías removiendo los efectos de alta variación de los individuos. Los datos

obtenidos fueron analizados con el programa *Statistica v 6.1* (StatSoft, Inc.), utilizando un análisis de varianza (ANOVA) anidado y fijo. El modelo lineal anidado utilizado fue:

$$(2) \quad Y_{ijkl} = T_i + P_j(T_i) + I_k(T*P) + e_{(ijk)l}$$

En donde:

$Y_{ijkl}$  = expresión relativa ( $2^{-\Delta Cq}$ ) de la *miostatina* en el tejido  $i$ , de la ploidía  $j$ , del individuo  $k$  dentro de cada tejido y ploidía.

$T_i$  = efecto del tipo de tejido  $i$ , en donde  $i=1, \dots, 5$  (manto, glándula digestiva, branquia, gónada, músculo aductor) en la expresión relativa de la *miostatina*.

$P_j(T_i)$  = efecto de la ploidía  $j=1, 2$  (diploide, triploide) anidado dentro de cada tejido en la expresión relativa de la *miostatina*.

$I_k(T*P)$  = efecto del individuo  $k$  ( $k=1, \dots, 8$ , el número de individuos diploides o el número de individuos triploides) dentro de cada tejido y ploidía.

$e_{(ijk)l}$  = error causado por las variaciones aleatorias en la expresión relativa de las pseudoréplicas (2) evaluadas para cada individuo dentro de cada tejido y ploidía.

Se realizaron análisis de medias para los factores tejido y ploidía dentro de tejido con el método de Tukey, estableciendo la significancia en  $P < 0.05$ .

#### 6.3.3.4. *Cuantificación de la expresión del gen de la miostatina (MSTN) en músculo aductor de organismos diploides y triploides en diferentes etapas del desarrollo*

El análisis cuantitativo de la expresión del gen de la *MSTN* se llevó a cabo en muestras de músculo aductor de organismos diploides y triploides, obtenidas en cinco diferentes meses y/o días en cultivo (Dic-08, 231 d; Feb-09, 282 d; Abr-09, 351 d; Jun-09, 406 d; y Ago-09, 476 d). De cada individuo y fecha, se analizaron dos réplicas por qPCR para cada gen (*MSTN*, rpL8,  $\beta$ -Actina) utilizando las mismas condiciones de qPCR y volumen de reacción utilizados en la obtención de la curva estándar para cada gen.

Se estimó el valor de expresión génica de la *MSTN* de la misma forma antes descrita para esta variable en tejidos y al igual que en el caso del análisis de expresión entre tejidos, los datos de cada mes (o edad) evaluada fueron primero analizados con el programa *Statistica v 6.1* (StatSoft, Inc.) utilizando un ANOVA anidado de dos factores (ploidía e individuo), anidando a los individuos dentro de su correspondiente ploidía. Al igual que en los análisis anteriores, esto permitió estimar diferencias entre ploidías en cada fecha de muestreo al remover los efectos de la alta variación observada entre individuos en análisis preliminares de la expresión del gen de la *MSTN*, así como obtener una estimación de la variación causada por individuos. El modelo lineal utilizado para cada uno de los meses de evaluación fue:

$$(3) \quad Y_{ijk} = P_i + I_j(P_i) + e_{(ij)k}$$

En donde:

$Y_{ijk}$  = expresión relativa ( $2^{-\Delta Cq}$ ) de la *miostatina* del individuo  $k$  dentro de cada ploidía  $j$ , estimada independientemente para cada uno de los meses de muestreo.

$P_i$  = efecto fijo de la ploidía  $i$ , en donde  $i=1, 2$  (diploide, triploide) en la expresión relativa de la *miostatina* para cada uno de los meses de muestreo.

$I_j$  = efecto aleatorio del individuo  $j$ , en donde  $j=1, \dots, 8$  (el individuo diploide o triploide) en donde se evaluó la expresión relativa de la *miostatina*.

$e_{(ij)k}$  = error causado por las variaciones aleatorias en la expresión relativa de las pseudoréplicas (2) evaluadas para cada individuo dentro de cada ploidía.

Al igual que en el caso de los análisis de tejidos, para conocer los efectos del mes de muestreo y de la ploidía dentro de cada mes de muestreo sobre la expresión relativa de la *MSTN* se realizó también un ANOVA anidado completo, incluyendo como tercer factor a los individuos. El modelo lineal utilizado fue:

$$(4) \quad Y_{ijkl} = M_i + P_j(M_i) + I_k(M*P) + e_{(ijk)l}$$

En donde:

$Y_{ijkl}$  = expresión relativa ( $2^{-\Delta Cq}$ ) de la *miostatina* en el mes  $i$ , de la ploidía  $j$ , del individuo  $k$  dentro de cada mes y ploidía,

$M_i$  = efecto del mes de evaluación  $i$ , en donde  $i=1, \dots, 5$  (Dic-08, Feb-09, Abr-09, Jun-09, Ago-09) en la expresión relativa de la *miostatina*

$P_j(M_i)$  = efecto de la ploidía  $j=1, 2$  (diploide, triploide) anidado dentro de cada mes en la expresión relativa de la *miostatina*

$I_k(M*P)$  = efecto del individuo  $k=1, \dots, 8$  (el número de individuos diploides o el número de individuos triploides) anidados dentro de la ploidía y el mes de muestreo.

$e_{(ijk)l}$  = error causado por las variaciones aleatorias en la expresión relativa de las pseudoréplicas (2) evaluadas para cada individuo dentro de cada mes y ploidía,

Se realizaron análisis de medias para los factores mes y ploidía dentro de mes con el método de Tukey, estableciendo la significancia en  $P < 0.05$ .

## 6.4. Análisis Histoquímicos

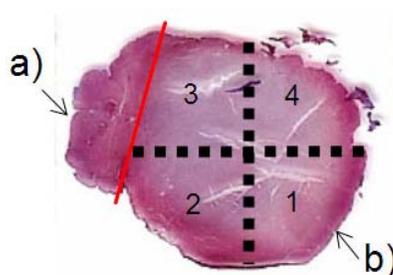
6.4.1. Estimación de componentes bioquímicos en músculo aductor de organismos diploides y triploides

Cortes histológicos.- De la porción transversal del músculo aductor de los muestreos de Jun-09 (406 d de cultivo) y Ago-09 (476 d) que fueron preservados en paraformaldehído al 4% en PBS, se realizaron cortes de 4  $\mu$ m con un microtomo rotatorio Leica RM 2155 (Leica Microsystems) que fueron montados en laminillas de vidrio para histología convencional.

6.4.2. Estimación de lípidos y carbohidratos

Se utilizó la técnica Negro Sudán B (SBB por sus siglas en inglés) (Rodríguez-Moscoso y Arnaiz, 1998) para estimar la abundancia relativa de lípidos, y la técnica de PAS (Periodic Acid Schiff o ácido periódico de Schiff) para la estimación de la abundancia relativa de los carbohidratos (Lillie, 1965).

De cada laminilla por individuo diploide y triploide se digitalizaron aleatoriamente cuatro imágenes con el objetivo 20x, cada una dentro de un cuadrante delimitado en el músculo estriado del corte del músculo aductor (Fig. 3). Se utilizó un sistema digital de imágenes, integrado por un microscopio óptico de contraste de fases (Olympus BX50) y una cámara digital (CoolSNAP Pro, MediaCybernetics, Inc.) y el programa Image Pro Plus v.4.5 (Media Cybernetics, Inc). El total de imágenes obtenidas fue de 236 imágenes por técnica histoquímica (de un total de 24 individuos diploides y 35 triploides). El área evaluada para la estimación porcentual o relativa de la concentración de carbohidratos y lípidos por imagen fue constante, de  $9032.17 \mu\text{m}^2$ .



**Figura 3.** Corte histológico transversal ( $4 \mu\text{m}$ ) de músculo aductor de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*; a) músculo liso, b) músculo estriado; 1 a 4 denotan los cuadrantes delimitados para la digitalización de imágenes.

Para la obtención de las imágenes digitalizadas y la cuantificación relativa de lípidos y carbohidratos por área de imagen digitalizada se estandarizaron primero las condiciones ‘ideales de iluminación’ que permitiesen obtener imágenes representando claramente cada una de las tinciones. Las condiciones ideales de iluminación fueron obtenidas controlando la intensidad de luz utilizando consistentemente para cada laminilla el mismo nivel de iluminación dependiendo de la técnica histoquímica (lípidos o carbohidratos), así como utilizando filtros de corrección de color. Una vez obtenidas tales condiciones, las laminillas con cada uno de los músculos de los individuos diploides y triploides fueron digitalizadas manteniendo el diafragma que regula la cantidad de luz y el condensador que concentra el

haz luminoso sobre la preparación en la misma posición dependiendo de la estandarización definida para cada técnica histoquímica.

El análisis de las imágenes obtenidas se realizó por el método de identificación automática de píxeles (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008), que consiste en la conversión de una imagen en color a un nivel de intensidad de un determinado colorante (Otsu, 1979). Con este método se estima la proporción relativa de un determinado componente bioquímico presente en una muestra basándose en la proporción de píxeles que se encuentra en el área comprendida dentro de cada imagen.

Los datos obtenidos del análisis de imágenes fueron analizados con el programa *Statistica v 6.1* (StatSoft, Inc.) para establecer posibles diferencias entre organismos diploides y triploides muestreados en Jun-09 y Ago-09 (406 d y 476 d) para cada uno de los componentes bioquímicos, utilizando nuevamente un análisis de varianza (ANOVA) anidado, incluyendo los factores edad, ploidía dentro de edad, e individuo dentro de edad y ploidía. Antes del análisis, la proporción relativa por área de cada uno de los componentes bioquímicos obtenidos por individuo fue transformada a arcoseno (transformación angular) para evitar la dependencia de la varianza con la media observada en datos en porcentajes (Sokal y Rohlf, 1986) y promediados por individuo. El modelo anidado utilizado fue:

$$(5) \quad Y_{ijkl} = \mathbf{M}_i + \mathbf{P}_j(\mathbf{M}_i) + \mathbf{I}_k(\mathbf{M}^*\mathbf{P}) + \mathbf{e}_{(ijk)l}$$

En donde:

$Y_{ijkl}$  = abundancia relativa del componente bioquímico (carbohidratos o lípidos) del individuo  $k$  dentro de cada mes  $i$  y ploidía  $j$ ,

$\mathbf{M}_i$  = efecto del mes de evaluación (o edad de evaluación)  $i$ , en donde  $i=1 \dots 2$  (Jun-09, Ago-09) en la abundancia relativa del componente bioquímico.

$\mathbf{P}_j(\mathbf{M}_i)$  = efecto de la ploidía  $j=1, 2$  (diploide, triploide) dentro del mes correspondiente en la abundancia relativa del componente bioquímico.

$I_k(\mathbf{M}*\mathbf{P})$  = efecto de la variación del individuo  $k=1, \dots, 12$  o  $15$  (el número de individuos diploides o el número de individuos triploides) anidados dentro de la ploidía y el mes de muestreo.

$e_{(ijk)t}$  = error causado por las variaciones aleatorias en la abundancia relativa de componente bioquímico evaluada dentro de cada mes y ploidía

Se realizaron análisis de medias para los factores mes y ploidía dentro de mes con el método de Tukey, estableciendo la significancia en  $P < 0.05$ .

## 6.5. Análisis de Hipertrofia e Hiperplasia

### 6.5.1. Cuantificación del tamaño y número de fibras musculares en organismos diploides y triploides

Cortes histológicos y tinción.- Al igual que para los análisis histoquímicos, se utilizó la porción transversal del músculo aductor de los muestreos de Junio '09 (406 d) y Agosto '09 (476 d) preservadas, cortadas y montadas como ya se mencionó antes para los análisis histoquímicos.

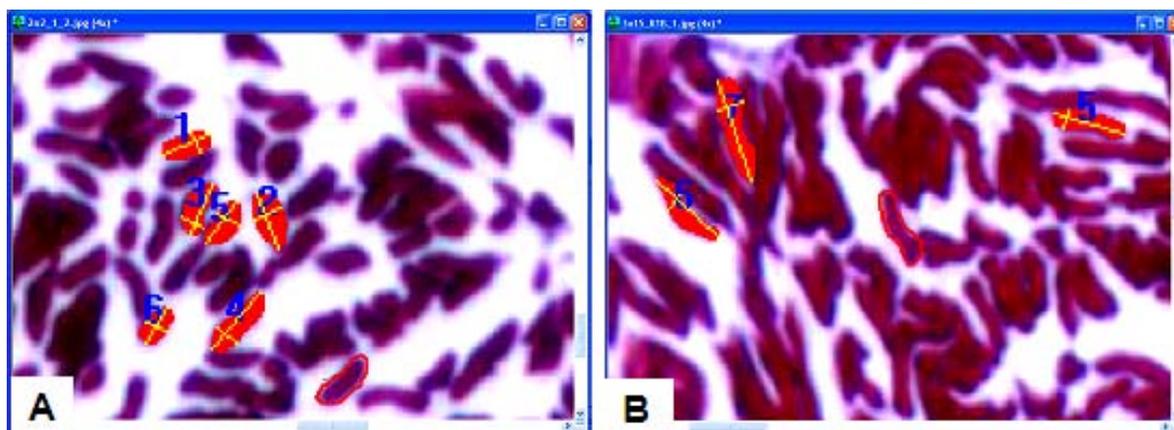
Los cortes transversales fueron teñidos con la técnica Tricrómica de Masson (Sheehan y Hrapchak, 1990). Esta técnica permite distinguir las fibras musculares de las fibras de colágeno, ya que las primeras se tiñen de rojo escarlata mientras que las segundas se tiñen de color azul.

#### 6.5.1.1. *Estimación del tamaño de las fibras musculares*

De cada corte transversal por individuo diploide y triploide se digitalizaron cuatro imágenes con el objetivo 20x y utilizando un sistema digital de imágenes, integrado por un microscopio óptico de contraste de fases (Olympus BX50), una cámara digital (CoolSNAP Pro, MediaCybernetics, Inc.) y el programa Image Pro Plus v.4.5 (Media Cybernetics, Inc). El total de imágenes obtenidas fue de 236. Cada imagen fue tomada aleatoriamente dentro

de cada cuadrante delimitado dentro del corte de músculo aductor (Fig. 3) de un total de 24 diploides y 35 triploides.

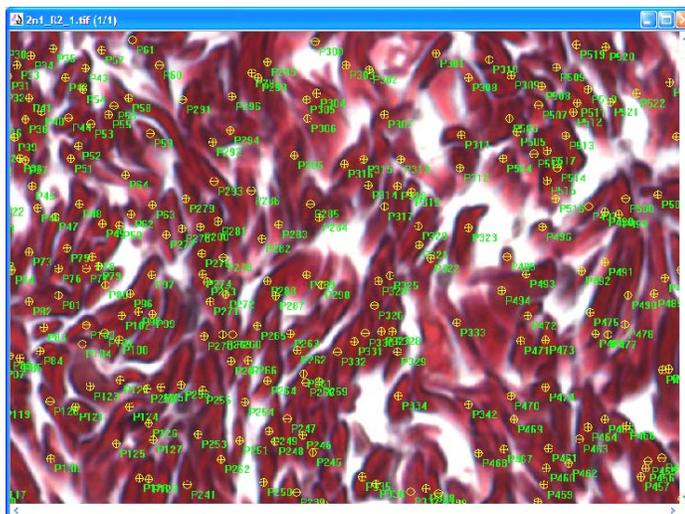
El tamaño de las fibras individuales fue estimado obteniendo el diámetro promedio y a partir del mismo el área total ( $\mu\text{m}^2$ ) de 50 fibras por imagen (o cuadrante) en corte transversal (200 fibras por individuo) utilizando el programa SigmaScan Pro 5.0.0 (Fig. 4).



**Figura 4.** Imágenes digitalizadas de cortes transversales de músculo estriado de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. (A) fibras musculares en un organismo diploide y (B) fibras musculares en un organismo triploide.

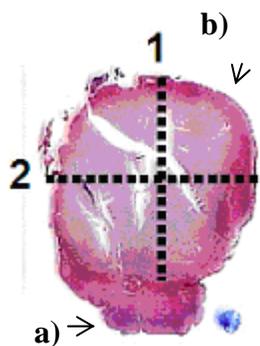
#### 6.5.1.2. *Estimación del número de fibras musculares*

De cada corte transversal por individuo diploide y triploide se digitalizaron tres imágenes con el objetivo 60x, en un sistema digital de imágenes como antes mencionado, y analizaron con el programa Image Pro Plus v.4.5 (Media Cybernetics, Inc.). Cada imagen fue tomada aleatoriamente dentro del corte transversal del músculo estriado del músculo aductor (Fig. 5).



**Figura 5.** Imagen digitalizada (60x) de cortes transversales de músculo de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* para estimar el número de fibras musculares.

Adicionalmente, de cada laminilla tanto de organismos diploides como triploides se digitalizó una imagen del corte transversal completo utilizando un escáner (HP Officejet Pro L7780, Hewlett Packard) para medir el área ocupada por el corte transversal de cada músculo aductor. De cada imagen se tomaron dos medidas (Fig. 6) para la obtención del diámetro promedio del músculo, y la aproximación del área muscular por individuo, similar a evaluaciones de área gonádica en otros moluscos (Enríquez-Díaz, 2004).



**Figura 6.** Imagen escaneada de un corte transversal del músculo aductor completo de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. a) músculo liso (no incluido en diámetro promedio) y b) músculo estriado.

### 6.5.2. Análisis de hipertrofia e hiperplasia muscular

Los datos de tamaño, número de fibras musculares y área muscular obtenidos fueron analizados con *Statistica v 6.1* (StatSoft, Inc.) utilizando un análisis de varianza (ANOVA) anidado para cada variable incluyendo tres factores, edad, ploidía dentro de edad, e individuo dentro de edad y ploidía. El modelo anidado lineal utilizado fue:

$$(6) \quad Y_{ijkl} = \mathbf{M}_i + \mathbf{P}_j(\mathbf{M}_i) + \mathbf{I}_k(\mathbf{M}^*\mathbf{P}) + \mathbf{e}_{(ijk)l}$$

En donde:

$Y_{ijkl}$  = tamaño, número de fibras musculares, o área muscular del individuo  $k$  dentro de cada mes  $i$  y ploidía  $j$ ,

$\mathbf{M}_i$  = efecto del mes de evaluación (o edad de evaluación)  $i$ , en donde  $i=1 \dots 2$  (Jun-09, Ago-09) en el tamaño o número de las fibras musculares.

$\mathbf{P}_j$  = efecto de la ploidía  $j$ , en donde  $j=1, 2$  (diploide, triploide) en el tamaño o número de las fibras musculares.

$\mathbf{I}_k(\mathbf{M}^*\mathbf{P})$  = efecto de la variación del individuo  $k=1, \dots 12$  o  $15$  (el número de individuos diploides o el número de individuos triploides) anidados dentro de la ploidía y el mes de muestreo.

$\mathbf{e}_{(ijk)l}$  = error causado por las variaciones aleatorias en el tamaño o número de las fibras musculares evaluadas para cada individuo dentro de cada mes y ploidía.

Se realizaron análisis de medias de los factores edad y ploidía dentro de edad con el método de Tukey, estableciendo la significancia en  $P < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Aislamiento, Hibridación *in situ* y Análisis de Expresión de la *Miostatina*

#### 7.1.1. Obtención de secuencia parcial del transcrito del gen de la *MSTN* en *Nodipecten subnodosus*

La amplificación con los cebadores redundantes y específicos *MSTN-F* y *MSTN-R* permitieron la obtención de una secuencia de 562 pb (Fig. 7). El análisis *in silico* en Blastn indicó que la secuencia de nucleótidos obtenida de la *miostatina* (*MSTN*) en *N. subnodosus* tiene un 85% de similitud con la secuencia del pectínido *Argopecten irradians* (GenBank AY553362.1) y un 83% y 84% con las secuencias de *Chlamys farreri* (GenBank EU563852.1 y DQ988329.3 respectivamente). La traducción conceptual con el marco de lectura +2 dio una secuencia de 187 aminoácidos, conteniendo 77 aminoácidos del dominio N-terminal del pro-péptido, el sitio de procesamiento proteolítico de 4 aminoácidos y 106 aminoácidos del dominio C-terminal que consiste en el ligando activo (Fig. 7). En el análisis *in silico* en Blastp, la secuencia proteica dio como resultado un valor de significancia (E)  $3^{-106}$  y con similitud del 98% de aminoácidos idénticos con la secuencia de *Argopecten irradians* (GenBank AAT36326.1) y de E =  $4^{-103}$  con el 96% de aminoácidos idénticos con la secuencia de *Chlamys farreri* (GenBank ABJ09581.2) (Fig. 8). En contraste, con vertebrados la similitud de la secuencia proteica obtenida dio como resultado una significancia de E =  $2^{-30}$  con similitud de 58% de aminoácidos idénticos con la secuencia del bóvido *Bubalus bubalis* (GenBank ACN65843.1) y del 57% de aminoácidos idénticos con la secuencia de *Equus caballus* (GenBank BAB16046.1). Con la búsqueda de dominios proteicos se encontró que dentro del marco de lectura del propéptido de la *MSTN* (1-77 aminoácidos), se encuentra una región similar al dominio del propéptido de la superfamilia de Factores Transformantes del Crecimiento TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor-Beta).

```

1   R E I G R R K R H N M K A A G W H H F D
1   ACGAGAAATCGGAAGAAGAAAACGACATAATATGAAAGCAGCAGGGTGGCACCATTTTGA
      MSTN-F
21  I L D E V Q K W T Y R T H L N L G L V V
61  TATACTAGATGAGGTACAAAAGTGGACCTACAGGACACATCTGAACCTTGGGCTTGTGTG

41  E A L D E A G N N L V I L P P T F G A D
121 CGAAGCTTTGGACGAGGCGGGCAATAACTTGGTTATACTTCCCCGACGTTTGGAGCTGA

61  D G Y E P M L D L R T S L R K S T R S K
181 TGATGGATATGAGCCAATGCTGGATTGCGCACATCTCTAAGGAAGTCAACACGCTCTAA

81  R S A E L Y C D T R E E T A C C R Y P L
241 GAGATCTGCCGAACATATATTGACACGAGAGAAGAAACAGCTTGTTCAGATATCCTCT

101 E V D F V A F G W D F V I A P L T Y A A
301 AGAAGTCGATTTGTCGCGTTGGGTGGGACTTTGTGATAGCTCCACTTACATATGCTGC

121 Y Y C A G E C K G E Q L D D T L H A H V
361 CTATTACTGCGCCGCGAATGTAAAGGTGAACAATTGGACGATACGTTACATGCTCATGT

141 I Q Q A P S P T L S Q P Q S A I S N V G
421 GATCCAGCAAGCACCGTCCCCAACCTTGAGTCAGCCCCAGTCAGCCATAAGCAACGTCGGT

161 P C C T P T K M S D L A M L F F D H N S
482 CCCTGTTGCAC TCCGACTAAAATG TCCGATCTAGCAATGCTTTTCTTCGACCACAAC TCG

181 N I A L T R L
542 AACATAGCATTGACGCGATTG
      MSTN-R

```

**Figura 7.** Traducción conceptual de la secuencia parcial obtenida de la *MSTN* en *N. subnodosus*. En naranja se señala la localización de los cebadores degenerativos y específicos utilizados para la amplificación del gen de la *MSTN*. En **negritas** se muestra el sitio de procesamiento proteolítico (**RXXR**) de la *MSTN*. En azul el dominio N-terminal del pro-péptido y en verde el dominio C-terminal donde se encuentra el ligando activo.

```

N.subnodosus          -----REIGRRKRHNMKAAGWHHFDILDEVQKWTYRTHLNLGL 38
A.irradians_AAT36326.1 DPPGKFSKVPTKREIGRRKRHYMKASGWHHFDILDEVQKWTYRTHLNLGL 222
C.farreri_ABJ09581.2  DPPGKFSKVPTKREIGRRKRHYMKAAAGWHHFDILDEVQKWTYRPHLNLGL 297
                      ***** *:*****:*****

N.subnodosus          VVEALDEAGNNLVILPPTFGADDGYEPMLDLRISLRKSTRSKRS AELYCD 88
A.irradians_AAT36326.1 VVEALDETGHNLVVLPPTFGDDDDGYEPMLDLRISLRKSTRSKRSTELYCD 272
C.farreri_ABJ09581.2  VAEALDETGRRNVVLPPTFGVNDGYEPMLDMRTISLRKSTRSKRSTELYCD 347
                      *.*****:*.*:*****:*****:*****:*****

N.subnodosus          TREETACCRYPLEVDVFAFGWDFVIAPLTYAAYYCAGECKGQLDDTLHA 138
A.irradians_AAT36326.1 TREETACCRYPLEVDVFAFGWDFVIAPLTYAAYYCAGECKGQLDDTLHA 322
C.farreri_ABJ09581.2  QREETACCRYPLEVDVFAFGWDFVIAPLTYAAYYCAGECKGQLDDTLHA 397
                      *****

N.subnodosus          HVIQQAPSPPTLSQPQSAINVGPCCPTKMSDLAMLFFDHNSNIALTRL- 187
A.irradians_AAT36326.1 HVIQQAPSPPTLSQPQSAINVGPCCPTKMSDLAMLFFDHNSNIALTRLP 372
C.farreri_ABJ09581.2  HVIQQAPSPPTLSPQSALSINVGPCCPTKMSDLAMLFFDHNSNIALTRLP 447
                      ***** *:*****:*****

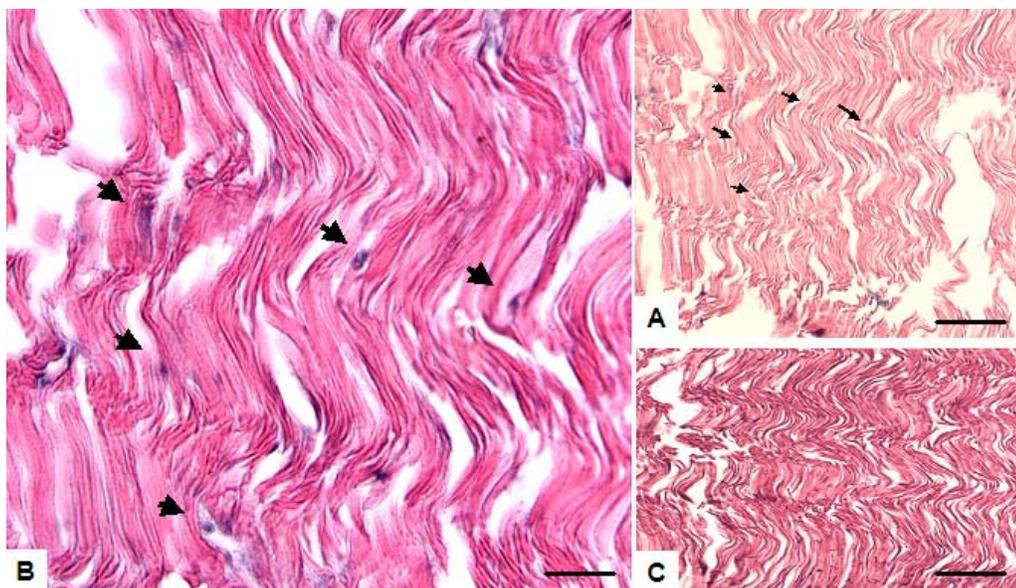
N.subnodosus          -----
A.irradians_AAT36326.1 RMKVDRCGCA 382
C.farreri_ABJ09581.2  RMKVDRCGCA 457

```

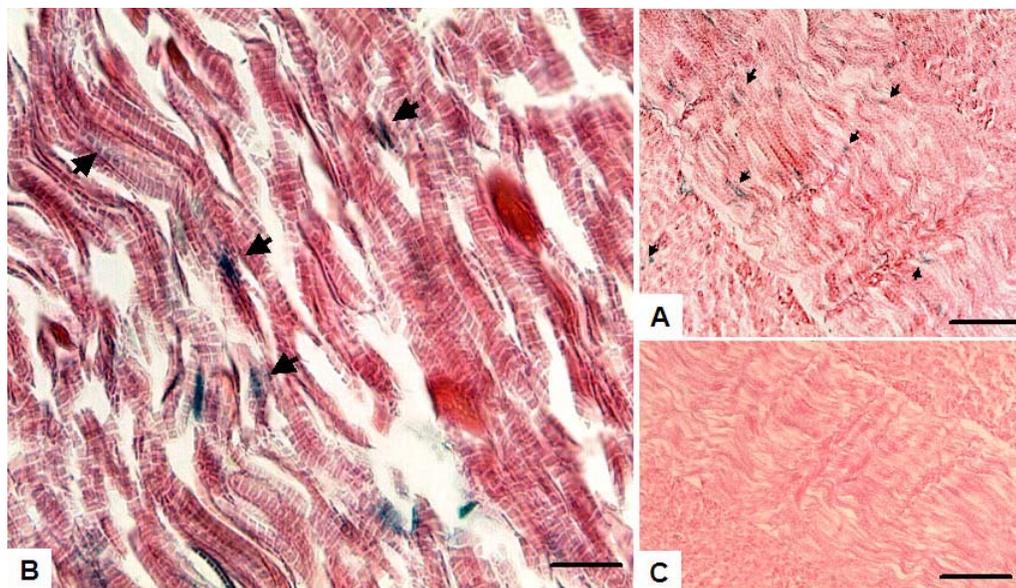
**Figura 8.** Alineamiento de la secuencia obtenida de la *miostatina* en *N. subnodosus* (*MSTN*) de 187 aminoácidos con la secuencia de *Argopecten irradians* y de *Chlamys farreri*. (\*) indica los aminoácidos similares; (:) indica las sustituciones conservadas; y (.) indica las sustituciones semi-conservadas entre las secuencias. Los colores de los aminoácidos indican las propiedades fisicoquímicas de los mismos.

### 7.1.2. Localización del transcrito de la *miostatina* (*MSTN*) en músculo aductor de *Nodipecten subnodosus* por hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* con la sonda “antisentido” de *miostatina* (*MSTN*) en cortes de músculo aductor de organismos diploides y triploides (Fig. 9 y 10), permitió localizar la presencia de este gen siendo expresado en el sarcoplasma o citoplasma de las fibras o células musculares tanto de diploides como triploides. Una mejor señal fue observada en los triploides (Fig. 10B) en contraste con los diploides (Fig. 9B), posiblemente asociada con el mayor grosor que presentan las fibras musculares de los organismos triploides en contraste con los diploides. La hibridación *in situ* con la sonda “sentido” de *MSTN* en fibras del músculo aductor tanto del organismo diploide como el triploide muestran una señal negativa (Fig. 9C y 10C).



**Figura 9.** Hibridación *in situ* de la *miostatina* (*MSTN*) en cortes de músculo aductor de un organismo diploide ( $2n$ ) de *N. subnodosus*. (A, B) La señal de la hibridación de la *MSTN* con la sonda “antisentido” fue encontrada en fibras del músculo estriado, en el sarcoplasma de las fibras musculares. La hibridación *in situ* con la sonda “sentido” (C), no mostró señal. Barra de escala A & C) 20  $\mu$ m, B) 10  $\mu$ m.

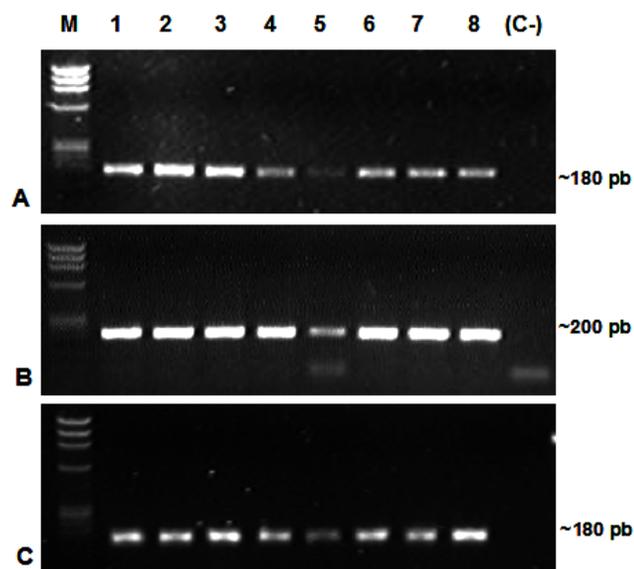


**Figura 10.** Hibridación *in situ* de la *miostatina* (*MSTN*) en cortes de músculo aductor de un organismo triploide ( $3n$ ) de *N. subnodosus*. (A, B) La señal de la hibridación de la *MSTN* con la sonda “antisentido” fue encontrada en fibras del músculo estriado, en el sarcoplasma de las fibras musculares. La hibridación *in situ* con la sonda “sentido” (C), no mostró señal. Barra de escala = A & C) 20  $\mu$ m, B) 10  $\mu$ m.

### 7.1.3. Expresión del gen de la *miostatina* (*MSTN*) por qPCR de tiempo real

#### 7.1.3.1. Caracterización cualitativa por PCR de punto final

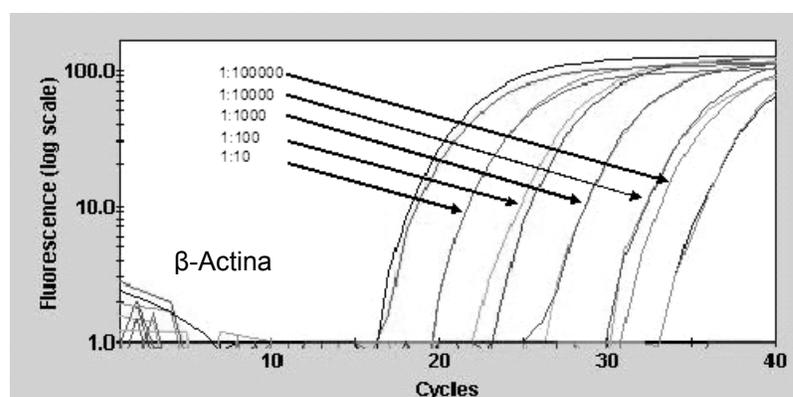
La amplificación por PCR punto final permitió verificar la integridad del ADNc tanto de músculos de los cinco muestreos (Dic-08, Feb-09, Abr-09, Jun-09 y Ago-09) así como de las cinco muestras de gónada y branquia del mes de Ago-09. En el caso del manto sólo tres de cinco muestras de diploides resultaron útiles para los análisis de expresión, y en la glándula digestiva, dada la dificultad para la obtención de ARN, la amplificación permitió determinar que sólo cuatro de las cinco muestras de diploides eran útiles para los análisis de expresión (ejemplo en la Fig. 11).



**Figura 11.** Productos de amplificación obtenidos por PCR de punto final de los genes (A) *MSTN*, (B)  $\beta$ -actina y (C) *rpL8*, con ADNc de músculo aductor de 8 organismos diploides del muestreo de Dic-08. Cada reacción incluye un control negativo (C-). M se refiere al marcador de peso molecular  $\Phi$ x174/HaeIII.

### 7.1.3.2. Estandarización de la reacción por PCR cuantitativo (qPCR)

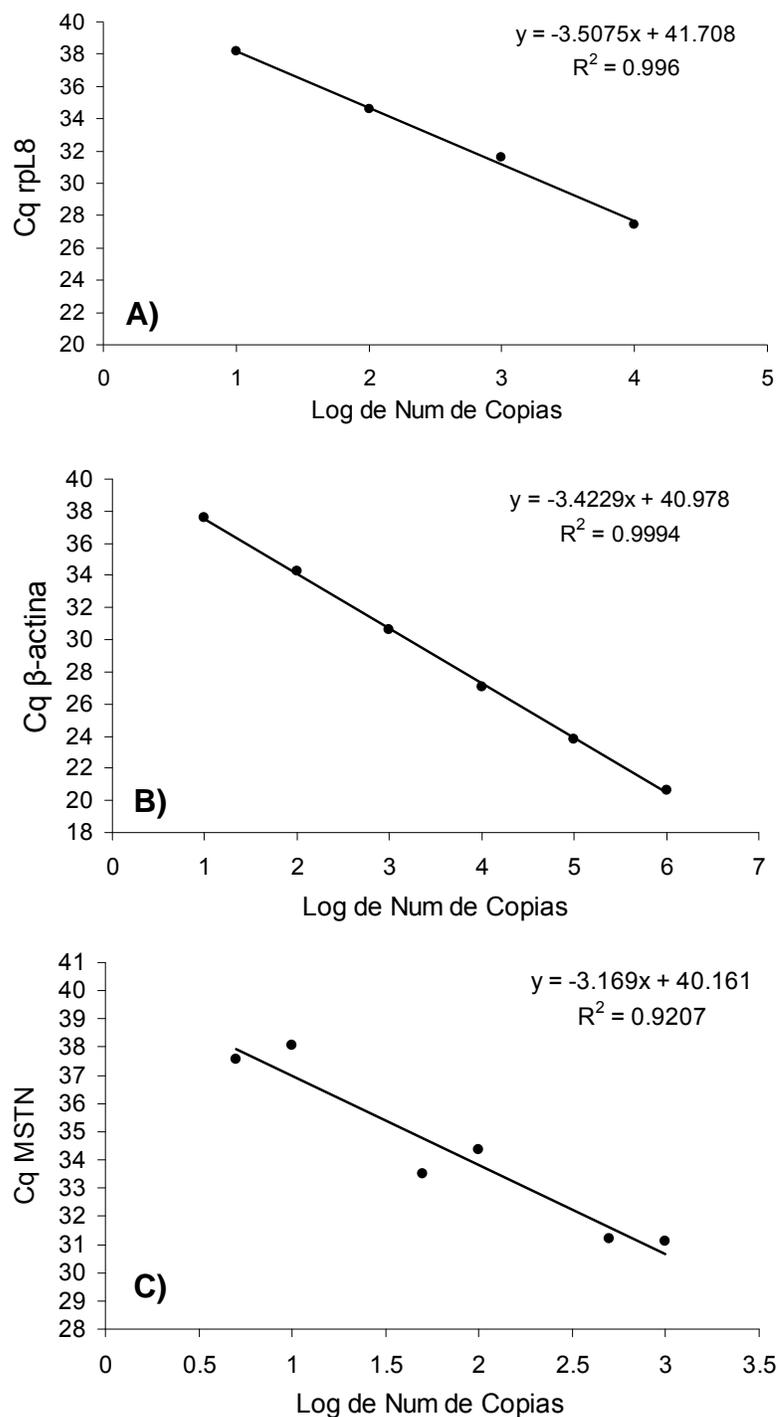
La amplificación de las diluciones seriales de ADNc permitió generar curvas estándar (Fig. 13) para evaluar la eficiencia de amplificación de cada gen. Las curvas presentaron una adecuada separación (ejemplo en la Fig.12) reflejándose en altos valores de  $R^2$  para los tres genes (Tabla III).



**Figura 12.** Curvas de amplificación de diluciones seriales de ADNc de una muestra de músculo aductor de *N. subnodosus* para el gen de  $\beta$ -actina.

**Tabla III.** Eficiencia de amplificación y valores de  $R^2$  obtenidos a partir de las curvas logarítmicas de amplificación de los genes de referencia rpL8 y  $\beta$ -Actina, y la *MSTN* (*miostatina*).

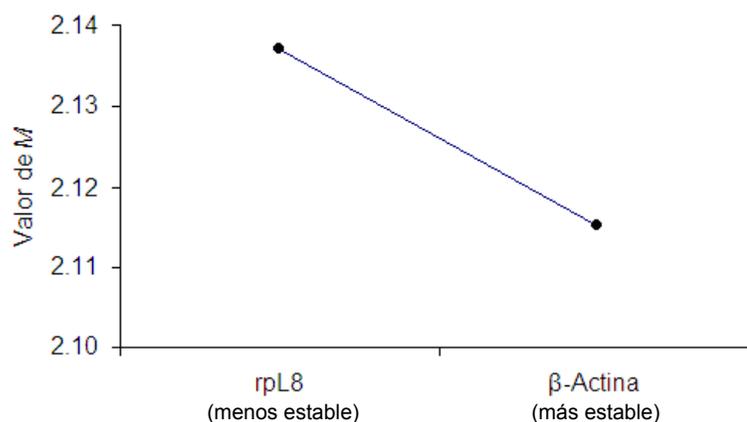
Gen	Eficiencia de amplificación (E)	$R^2$
rpL8	1.93	0.9960
$\beta$ -Actina	1.96	0.9994
<i>MSTN</i>	2.07	0.9207



**Figura 13.** Curvas logarítmicas de amplificación de diluciones seriales de ADNc de músculo aductor de diploides de *N. subnodosus* para los genes A) rpL8, B)  $\beta$ -actina y C) *MSTN*. Los Cq (del inglés *quantification cycle*) de cada dilución se muestran en las abscisas y el Log base 10 del número de copias de cada dilución se muestra en las ordenadas.

### 7.1.3.3. Análisis de los genes de referencia

El análisis de estabilidad con *geNorm* mostró que ambos genes, rpL8 y  $\beta$ -Actina tienen un valor de  $M > 1.5$  (2.137 y 2.115 respectivamente), sin embargo indica que el gen  $\beta$ -Actina es más estable que el gen rpL8 (Fig. 14).

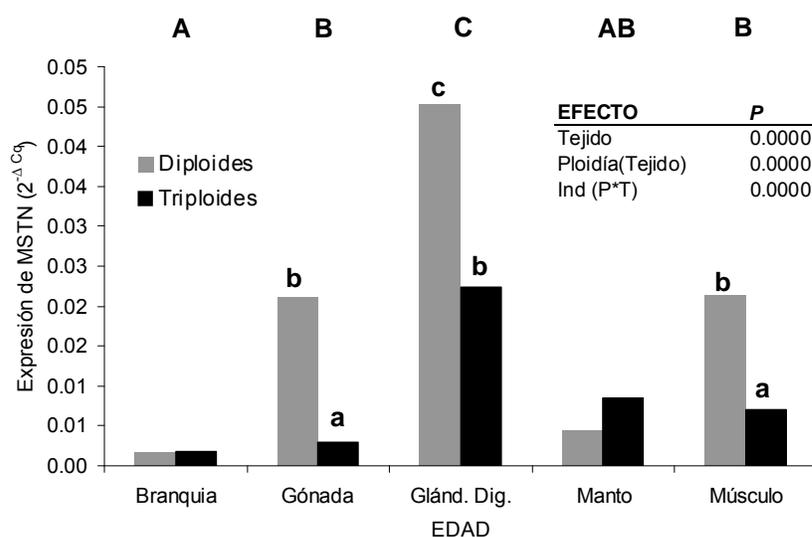


**Figura 14.** Valores de estabilidad ( $M$ ) obtenidos en *geNorm* a partir de valores de  $C_q$  o expresión de los genes de referencia rpL8 y  $\beta$ -Actina analizados con el programa. Valores mayores de 1.5 muestran menor estabilidad.

### 7.1.3.4. Cuantificación de la expresión del gen de la *MSTN* en diferentes tejidos de organismos diploides y triploides: músculo, manto, gónada, glándula digestiva y branquias

El análisis estadístico evaluando para cada tejido las diferencias entre ploidías en expresión de la *MSTN* normalizada indicó que hay diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre diploides y triploides en la gónada, la glándula digestiva, y el músculo aductor, observándose una mayor expresión de la *MSTN* en diploides. En las branquias y el manto no se observaron diferencias significativas entre diploides y triploides ( $P > 0.05$ ). Los componentes de varianza indican que la mayor parte de la variabilidad observada en la expresión de la *MSTN* es atribuible al factor individuo dentro de la ploidía, siendo la gónada y la glándula digestiva los tejidos que presentaron una mayor varianza debida a los individuos (Fig. 15).

En el análisis o ANOVA completo alterno que se realizó para comparar la expresión de la *MSTN* entre tejidos, fue la glándula digestiva en donde se observó la mayor expresión, y las branquias la menor expresión que no fue estadísticamente diferente de la expresión en el manto, con los otros tejidos, gónada y músculo, siendo intermedios en expresión a la glándula digestiva y las branquias.

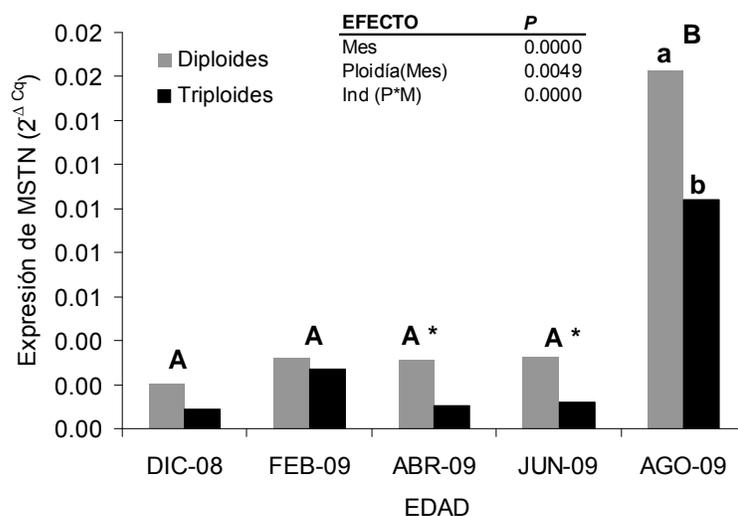


Efecto	Branquia		Gónada		Glánd. Dig.		Manto		Músculo	
	P	%σ <sup>2</sup>								
<b>Ploidía</b>	0.5241	na	<b>0.0000</b>	na	<b>0.0028</b>	na	0.1093	na	<b>0.0197</b>	na
<b>Individuo (Ploidía)</b>	<b>0.0129</b>	65	<b>0.0000</b>	99	<b>0.0000</b>	91	<b>0.0395</b>	79	<b>0.0149</b>	73
<b>Error</b>	---	35	---	1	---	9	---	21	---	27

**Figura 15.** Expresión relativa de la *MSTN* ( $2^{-\Delta Cq}$ ) en los tejidos branquia, gónada, glándula digestiva, manto y músculo aductor de organismos diploides y triploides de *N. subnodosus* muestreados en el mes de Ago-09. Los análisis individuales por tejido para determinar diferencias entre ploidías para cada tejido removiendo el efecto aleatorio de variación individual se presentan en la tabla inferior (la contribución porcentual de los individuos a la varianza total se incluye en la tabla; en **negritas** se denotan los efectos o factores significantes; na = no aplica por ser factor fijo). Los resultados del ANOVA anidado completo se incluyen dentro de la gráfica (letras mayúsculas diferentes en la parte superior indican diferencias significativas entre tejidos y letras minúsculas diferentes indican diferencias entre ploidías dentro de tejidos).

#### 7.1.3.5. Cuantificación de la expresión del gen de la miostatina (*MSTN*) en músculo aductor de organismos diploides y triploides en diferentes etapas de su crecimiento

Los análisis estadísticos de la expresión de la *MSTN* realizados individualmente en cada etapa del desarrollo, indicaron que hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre diploides y triploides únicamente en los meses de Abr-09 y Jun-09. Sin embargo, en los meses donde no se presentaron diferencias significativas se observó una tendencia consistente de mayor expresión de la *MSTN* en diploides que triploides. Al igual que en el análisis con los tejidos, los componentes de varianza indican que la mayor parte de la variabilidad observada en la expresión de la *MSTN* es atribuible al factor individuo dentro de la ploidía más que al error, siendo los meses de Feb-09 y Abr-09 en los que se presentó un mayor varianza atribuible a una expresión diferencial entre los individuos (Fig. 16). En el análisis o ANOVA completo alterno que se realizó para comparar la expresión de la *MSTN* entre meses de muestreo, fue en el mes de Ago-09 el único en donde se observaron diferencias en expresión relativa de la *MSTN* en relación a los otros meses evaluados, resultado de un incremento significativo en expresión de este gen tanto en diploides como triploides, pero significativamente mayor en diploides.



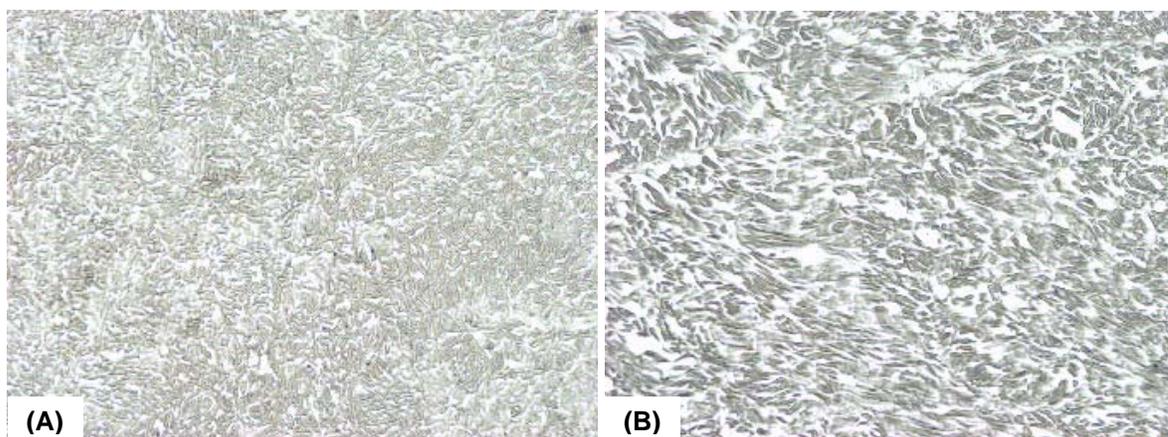
Efecto	DIC-08		FEB-09		ABR-09		JUN-09		AGO-09	
	P	%σ <sup>2</sup>								
Ploidía	0.2039	na	0.2492	na	<b>0.0000</b>	na	<b>0.0204</b>	na	0.0903	na
Individuo (Ploidía)	<b>0.0197</b>	50	<b>0.0000</b>	83	<b>0.0000</b>	98	<b>0.0015</b>	66	<b>0.0000</b>	78
Error	---	50	---	17	---	2	---	34	---	22

**Figura 16.** Expresión relativa de la *MSTN* ( $2^{-\Delta Cq}$ ) en músculo aductor de organismos diploides y triploides de *N. subnodosus*. Los análisis individuales por mes para determinar diferencias entre ploidías removiendo el efecto aleatorio de variación individual se presentan en la tabla inferior (la contribución porcentual de los individuos a la varianza total se incluye en la tabla; las diferencias entre diploides y triploides se denotan en la gráfica con asteriscos; en **negritas** se denotan los efectos o factores significantes; na = no aplica por ser factor fijo). Los resultados del ANOVA anidado completo se incluyen dentro de la gráfica (Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre meses y letras minúsculas diferentes indican diferencias entre ploidías dentro de meses).

## 7.2. Análisis Histoquímicos

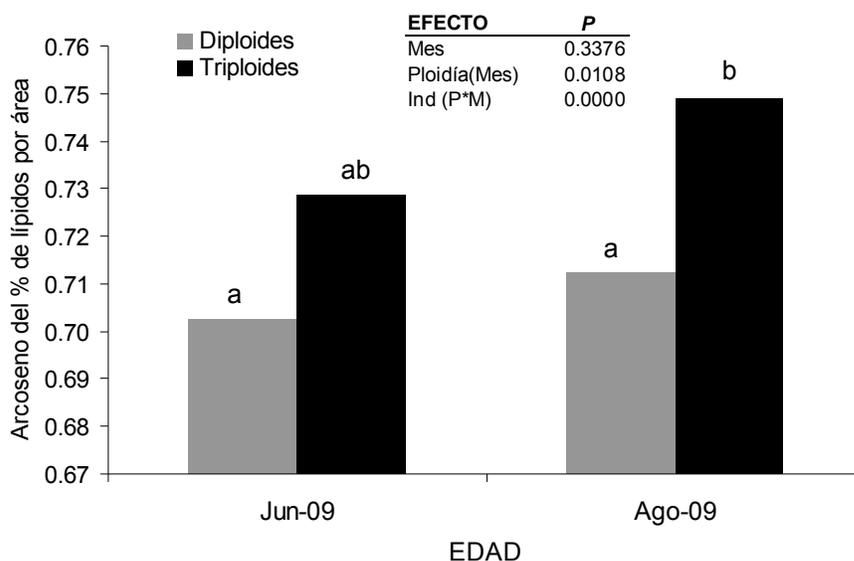
### 7.2.1. Estimación de lípidos en músculo aductor de organismos diploides y triploides

Las imágenes utilizadas para el análisis de lípidos en las laminillas obtenidas del corte transversal del músculo aductor de los individuos diploides y triploides de los meses de Jun-09 y Ago-09, a partir de donde se estimó la abundancia relativa de lípidos en cada individuo para cada etapa del desarrollo evaluada por medio del método de identificación automática de píxeles se muestran en la Fig. 17.



**Figura 17. Lípidos:** Micrografías (20x) de corte transversal del músculo aductor de: A) diploides -2n- y B) triploides -3n- de la almeja mano de león *N. subnodosus* muestreadas en Junio 09 y teñidas con Negro Sudán B.

El análisis estadístico para establecer los efectos del muestreo y las posibles diferencias entre diploides y triploides en la proporción relativa de lípidos presentes en un área constante del corte transversal del músculo, indicó efectos significativos únicamente de la ploidía ( $P = 0.0108$ ), con los triploides presentando una mayor abundancia de lípidos que los diploides. El análisis de medias por otro lado indicó que los diploides y triploides difirieron en concentración relativa de lípidos únicamente en el mes de Ago-09 ( $P < 0.05$ ), y no en el mes de Jun-09, con los triploides presentando mayor abundancia de lípidos que los diploides (Fig. 18).

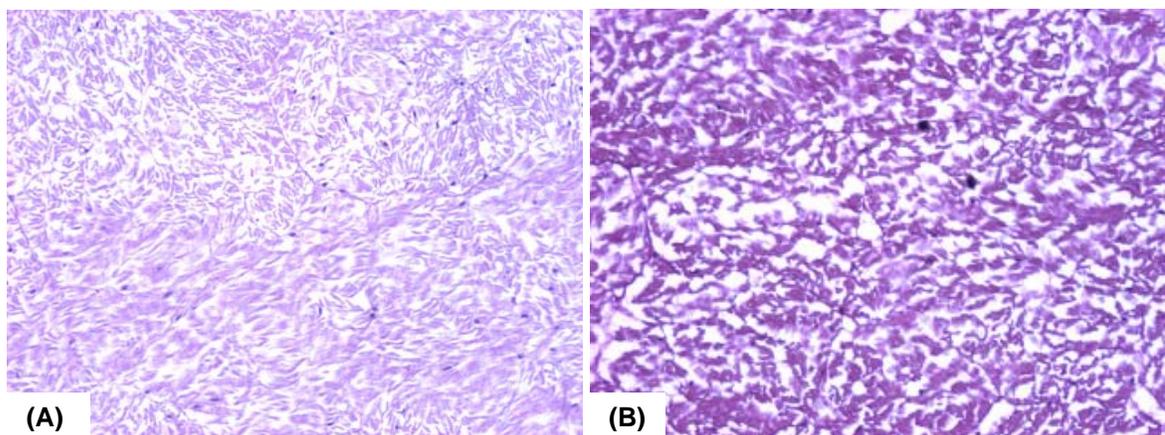


**Figura 18.** Abundancia relativa de lípidos por área en músculo aductor de organismos diploides y triploides de *N. subnodosus* con el método de identificación automática de píxeles. Se incluyen los resultados del ANOVA. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en las ploidías dentro de mes.

### 7.2.2. Estimación de carbohidratos en músculo aductor de organismos diploides y triploides

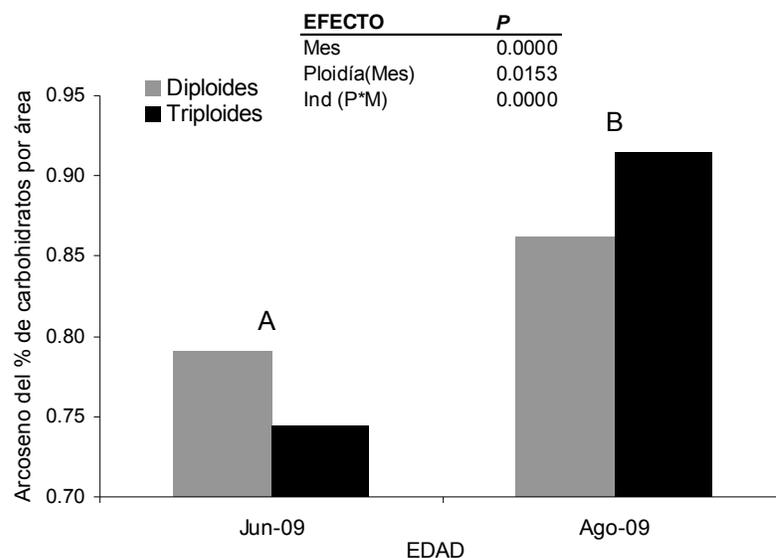
Las laminillas obtenidas del corte transversal del músculo aductor de los individuos diploides y triploides de los meses de Jun-09 y Ago-09, a partir de donde se estimó la abundancia relativa de carbohidratos en cada individuo para cada etapa del desarrollo evaluada por medio del método de identificación automática de píxeles, se muestran en la Fig. 19.

El análisis estadístico para establecer diferencias entre diploides y triploides en la proporción relativa de carbohidratos por área a las dos edades evaluadas, mostró efectos significantes de la edad y de la ploidía dentro de mes. Sin embargo, al realizar el análisis de Tukey para ploidía dentro de mes este no indicó diferencias significativas. Es posible que este resultado esté asociado con una inversión entre ploidías entre Jun-09 y Ago-09 para la



**Figura 19** Carbohidratos: Micrografías (20x) de corte transversal del músculo aductor de A) diploides  $-2n$ - y B) triploides  $-3n$ - de la almeja mano de león *N. subnodosus* muestreadas en Junio 09 y teñidas con la técnica histoquímica PAS (Periodic Acid Schiff).

concentración de carbohidratos. Esto es, en Jun-09 los diploides presentaron una 'tendencia' a una media de carbohidratos mayor que los triploides, pero en Ago-09 fueron los triploides los que presentaron una 'tendencia' a una media de carbohidratos mayor (Fig. 20).



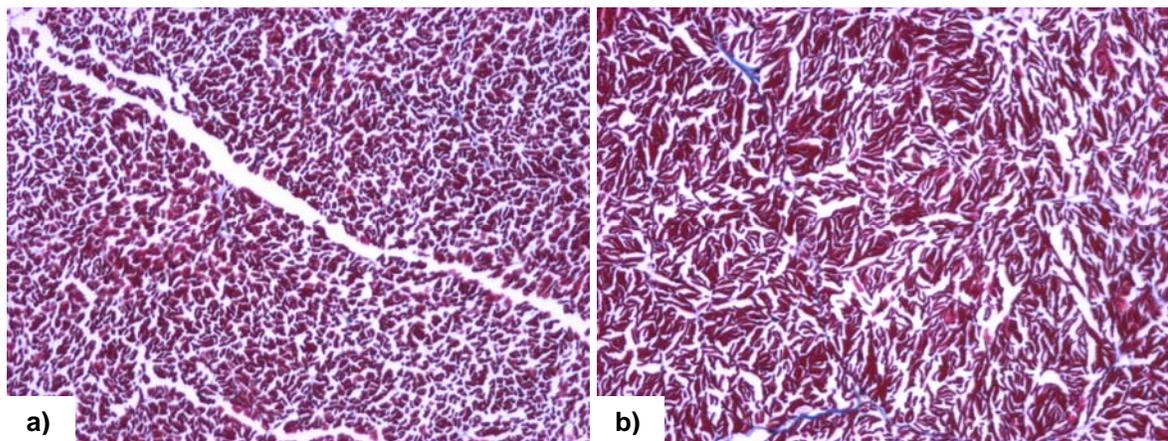
**Figura 20.** Abundancia relativa de carbohidratos por área en músculo aductor de organismos diploides y triploides de *N. subnodosus* con el método de identificación automática de píxeles. Se incluyen los resultados del ANOVA. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significantes entre los meses evaluados.

### 7.3. Análisis de Hipertrofia e Hiperplasia Muscular

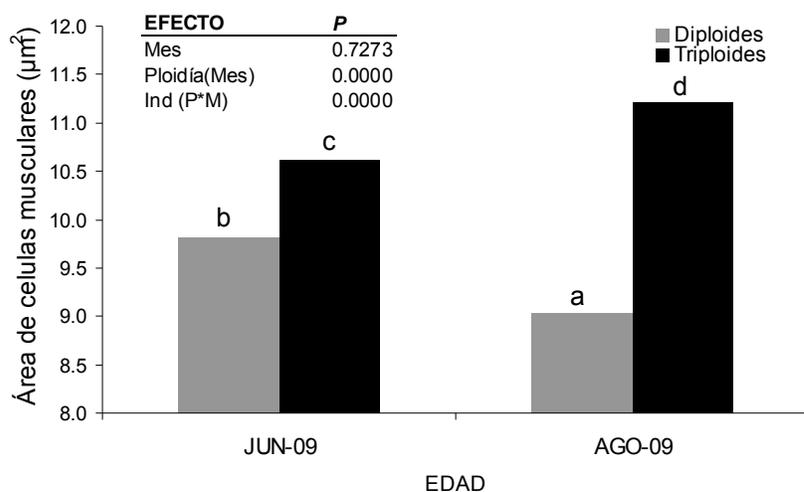
#### 7.3.1. Análisis de hipertrofia

Las laminillas obtenidas del corte transversal del músculo aductor de los individuos diploides (2n) y triploides (3n) durante los meses de Jun-09 y Ago-09 permitieron diferenciar las fibras musculares para la estimación de su tamaño y para el análisis de hipertrofia muscular (Fig. 21).

El análisis de varianza realizado para establecer si existían diferencias en el tamaño de las fibras musculares (células musculares) mostró diferencias significativas ( $P = 0.00$ ) entre los diploides y triploides, y aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos meses evaluados ( $P = 0.73$ ), al realizar el análisis de Tukey este indicó diferencias significativas entre diploides y triploides dentro de cada mes, siendo en ambos casos los triploides los que presentaron un mayor tamaño de fibras musculares en ambos meses evaluados. Otra diferencia entre diploides y triploides fue que el tamaño de fibra muscular decreció en los diploides de Jun-09 a Ago-09, pero en los triploides el tamaño de la fibra muscular incrementó entre esos mismos meses (Fig. 22).



**Figura 21.** Fibras Musculares: Micrografías (20x) de corte transversal del músculo aductor de a) diploides -2n- y b) triploides -3n- de la almeja mano de león *N. subnodosus* muestreadas en Junio 09 y teñidas con la tinción Tricrómica de Masson.

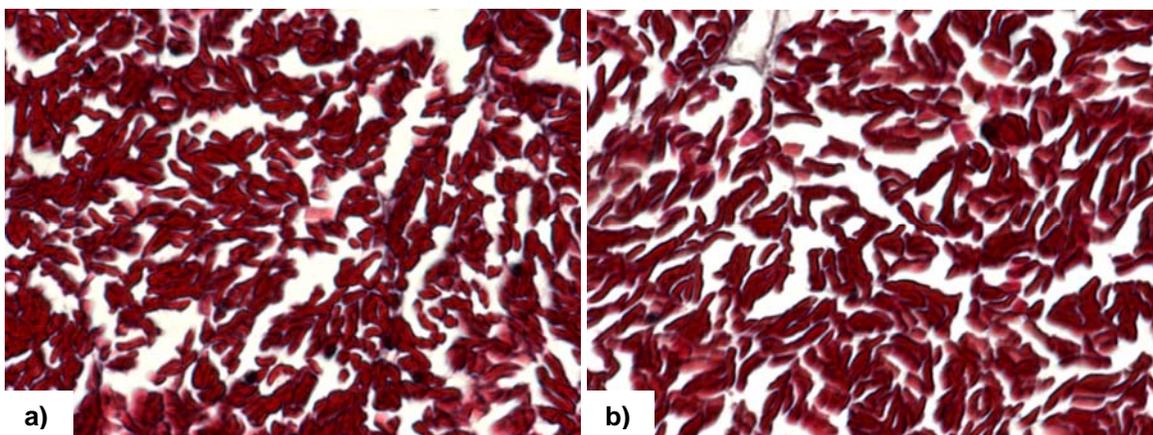


**Figura 22** Análisis del tamaño de fibras musculares estriadas en el músculo aductor de organismos diploides y triploides de *N. subnodosus*. Se incluyen los resultados del ANOVA. Letras diferentes en las medias por ploidía y mes indican diferencias estadísticamente significativas entre diploides y triploides.

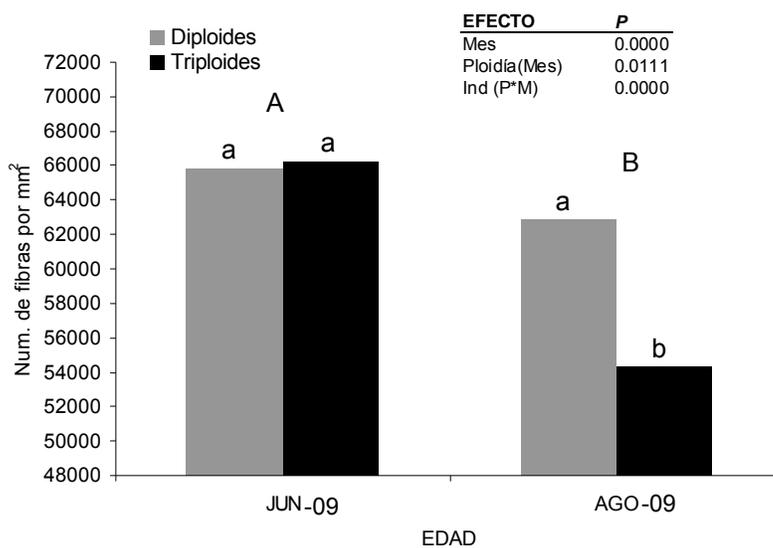
### 7.3.2. Análisis de hiperplasia y área muscular

Para el análisis de hiperplasia muscular se estimó el número de fibras musculares (Fig. 23) utilizando los mismos cortes transversales del músculo aductor de los individuos diploides (2n) y triploides (3n) que los utilizados para evaluar la hipertrofia en los meses de Jun-09 y Ago-09, pero utilizando una mayor magnificación (60x).

El análisis de varianza del número de fibras musculares cuantificadas por mm<sup>2</sup> mostró diferencias significativas entre meses de muestreo o edades de evaluación, así como también se encontraron diferencias significativas para la ploidía dentro de edad. El análisis de medias indicó que el número de fibras musculares decreció de Jun-09 a Ago-09, y ese decremento fue significativamente mayor en los triploides (Fig. 24).

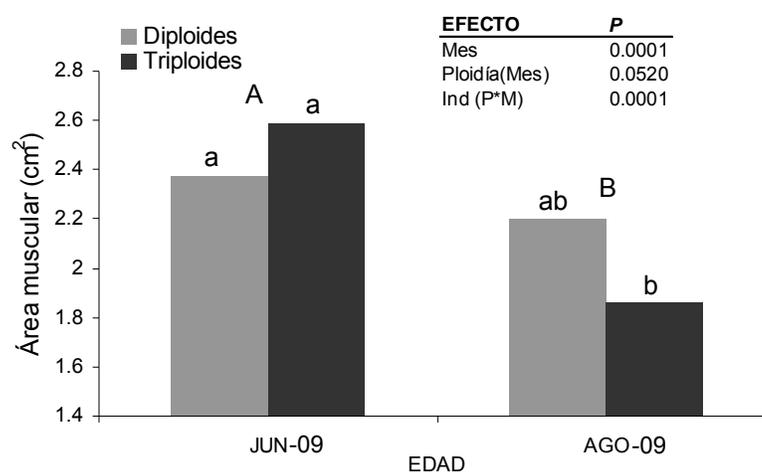


**Figura 23.** Cuantificación de Fibras musculares: Micrografías (60x) de corte transversal del músculo aductor de a) diploides (2n) y b) triploides (3n) de la almeja mano de león *N. subnodosus* teñidas con la tinción Tricrómica de Masson para la diferenciación del número de fibras musculares y tamaño del músculo aductor.



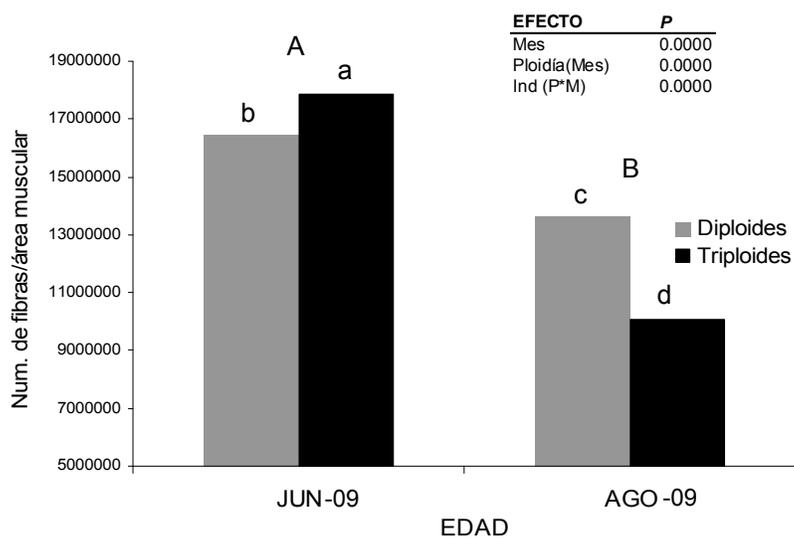
**Figura 24** Análisis del número de fibras musculares por mm<sup>2</sup> de organismos diploides y triploides de *N. subnodosus*. Se incluyen los resultados del ANOVA. Letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre ploidías dentro de mes. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre meses.

El análisis de varianza para establecer si existían diferencias en área total del músculo aductor entre ploidías y meses mostró diferencias significativas entre los dos meses evaluados ( $P < 0.05$ ), y aunque no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas entre ploidías ( $P = 0.052$ ), el análisis de medias entre ploidías a los meses evaluados indicó que mientras que el área muscular de los diploides no decreció significativamente entre Jun-09 y Ago-09, si lo hizo en los triploides (Fig. 25).



**Figura 25** Análisis del área del músculo aductor de organismos diploides y triploides de *N. subnodosus*. Se incluyen los resultados del ANOVA. Letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre ploidías dentro de mes. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre meses.

Adicionalmente a los análisis anteriores, se realizó un análisis para estimar el número de fibras por área total muscular, basado en el tamaño o área del músculo de los individuos y el número de fibras musculares por  $\text{mm}^2$ . El análisis del número total de fibras musculares mostró efectos significantes entre meses ( $P = 0.0$ ), y entre ploidías dentro de mes ( $P = 0.00$ ). El análisis de medias entre meses indicó que el número total de fibras musculares, irrespectivamente de la ploidía, decreció de Jun-09 a Ago-09, y que este decremento fue de mayor magnitud y solamente significativo en los triploides (Fig. 26).



**Figura 26** Análisis del número de fibras o células musculares en relación al área total del músculo aductor de organismos diploides y triploides de *N. subnodosus*. Se incluyen los resultados del ANOVA. Letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre ploidías dentro de mes. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre meses.

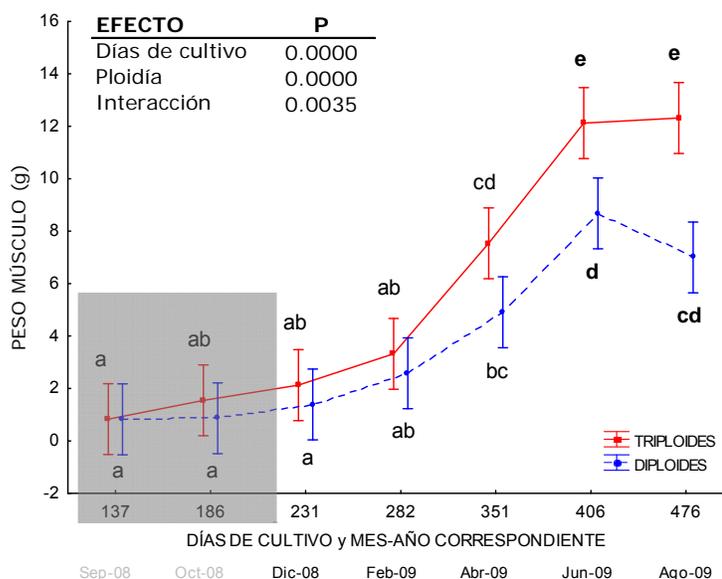
## 8. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue conocer si el gen de la *miostatina* tiene un papel o puede ser asociado con las diferencias en crecimiento muscular entre diploides y triploides de la almeja *Nodipecten subnodosus*, apoyando esta información en el trabajo de Ramírez-Arce (2009) quien evaluó el crecimiento y reproducción de los mismos organismos diploides y triploides en Bahía de Loreto. Los organismos utilizados en el presente trabajo se derivaron de los cinco muestreos finales de Ramírez-Arce (2009), y parte de la información de ese trabajo, particularmente el crecimiento y reproducción diferencial de los diploides y triploides, así como el impacto de las condiciones ambientales presentes durante ese crecimiento se integra en el presente con fines de discutir los resultados encontrados.

Los resultados en este trabajo se resumen en lo siguiente: (a) el gen de la *MSTN* se expresa diferencialmente entre diploides y triploides de la almeja *Nodipecten subnodosus*; (b) contrario a lo reportado previamente en otros pectínidos, este gen se encontró expresado no sólo en músculo aductor, sino en glándula digestiva y gónada; (c) las condiciones ambientales a las cuales son sometidos los organismos durante su crecimiento o engorda tienen un impacto sobre la expresión de este gen, incrementando la expresión del mismo en ambas ploidías bajo condiciones de elevada temperatura y baja productividad, pero aún con una mayor expresión en diploides que triploides; (d) existe una hipertrofia de las fibras musculares en los triploides, aunque ésta no es acompañada de una hiperplasia; (e) se observó una atrofia muscular en ambas ploidías en respuesta a condiciones ambientales estresantes, pero en los triploides ésta fue causada por una pérdida en el número de fibras musculares mientras que en los diploides fue causada por un decremento en el tamaño de las fibras musculares; y (f) la atrofia muscular fue acompañada de un incremento en glucógeno en músculo aductor de ambas ploidías, paralelo a un incremento altamente significativo en la expresión de la *MSTN*.

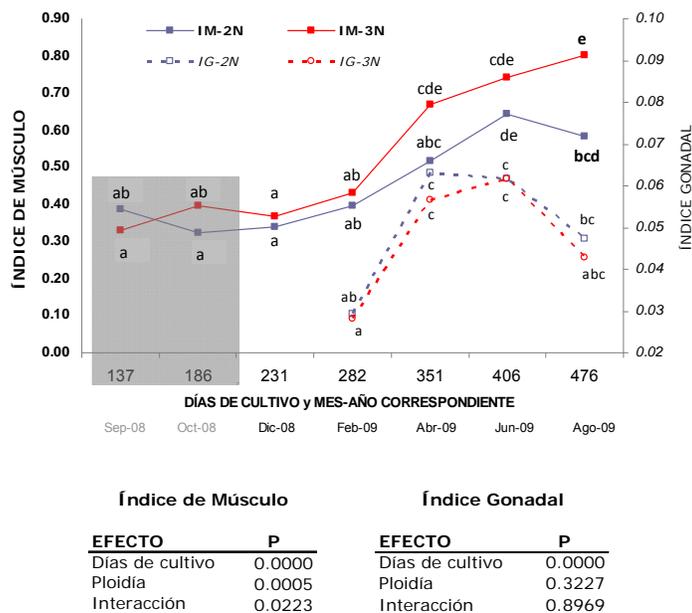
### 8.1. Crecimiento de diploides y triploides en función a las condiciones ambientales

Para los caracteres morfométricos evaluados por Ramírez-Arce (2009), el grupo triploide de la almeja *Nodipecten subnodosus* tuvo un mayor crecimiento promedio que el grupo diploide. Las mayores diferencias observadas entre ploidías fueron en el mes de Ago-09 para todos los caracteres evaluados. Sin embargo, fue entre los meses de Feb-09 y Abr-09 que los triploides presentaron un incremento significativo en peso de músculo aductor (Fig. 27) e índice muscular (Fig. 28), mientras que los diploides no presentaron tal incremento significativo entre los mismos meses.

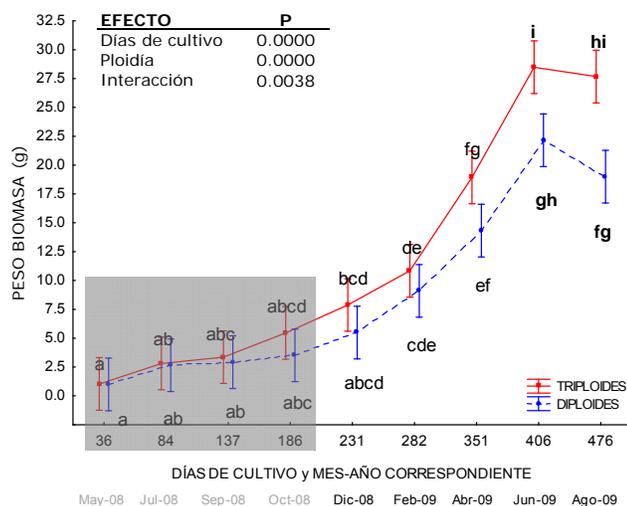


**Figura 27.** Peso de músculo aductor de *N. subnodosus* diploide y triploide observados durante el cultivo en Bahía de Loreto. Sin sombreado están aquellos meses en los que se evaluó la expresión de la *MSTN*. Tomado de Ramírez-Arce (2009).

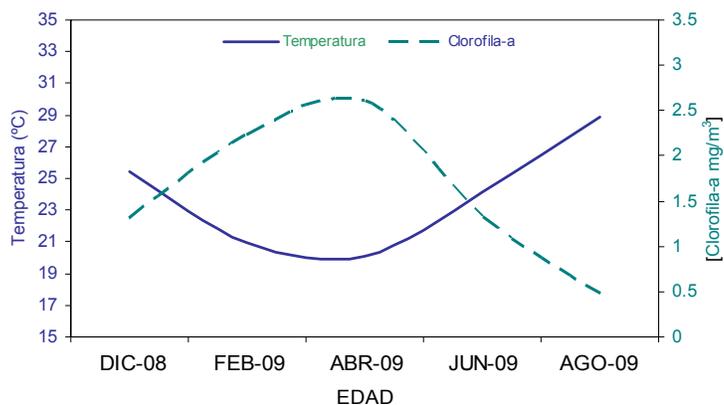
De acuerdo a lo reportado por Ramírez-Arce (2009), en el mes de Jun-09 los diploides presentaron su primera madurez sexual y en el mes de Ago-09 ya habían desovado, encontrando que los triploides fueron estériles durante todo el estudio. Al observar las diferencias en crecimiento entre ploidías en los meses de Abr-09 y Ago-09 principalmente en el músculo, se puede inferir que los organismos diploides utilizaron reservas energéticas para el desarrollo gonádico (Jun-09) además del desove (Ago-09), a diferencia de los triploides que por su condición estéril no presentan tal requerimiento. Para esta misma especie, Arellano-Martínez *et al.* (2004) concluyen que existe movilización de reservas del músculo aductor hacia la gónada para soportar la gametogénesis, reportando una disminución del índice del músculo aductor previo a la madurez sexual. Sin embargo, en el presente estudio en el mes de Jun-09, aunque los diploides se encontraban en un estadio gonádico avanzado y/o maduro, no se observaron diferencias significativas entre ploidías en índice muscular (Fig. 28) y se observó crecimiento en todos los organismos (Fig. 29). Esto puede ser resultado de las condiciones óptimas de temperatura y alimento que se presentaron a partir del mes de Abr-09, cuando se observó el promedio más alto de productividad primaria del año ( $2.61 \text{ mg clorofila-}a \text{ m}^{-3}$ ) acompañado de las menores temperaturas ( $20.1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Fig. 30) que fueron encontradas para el sitio de cultivo en Bahía de Loreto (Ramírez-Arce, 2009), permitiendo que en el mes de Jun-09 se apreciara un crecimiento para ambas ploidías a pesar del desarrollo gonádico en los diploides. Estos resultados son apoyados por estudios previos con triploides de esta especie, donde se ha observado que cuando se presenta una alta disponibilidad de alimento no se observa una ventaja de crecimiento de los triploides sobre los diploides (Maldonado-Amparo *et al.*, 2004; Racotta *et al.*, 2008).



**Figura 28.** Índices musculares y gonadales obtenidos para almeja *N. subnodosus* diploide y triploide de Dic-08 a Ago-09. Tomado de Ramírez-Arce (2009) para reflejar los meses que corresponden a este trabajo (sin sombrear en gris).



**Figura 29.** Peso de biomasa de *N. subnodosus* diploide y triploide observados durante el cultivo en Bahía de Loreto. Sin gris sombreado están aquellos meses en los que se evaluó la expresión de la *miostatina*. Tomado de Ramírez-Arce (2009).



**Figura 30** Variables ambientales de temperatura y clorofila-*a* registradas para Bahía de Loreto, B. C. Sur, México, para el periodo de tiempo evaluado.

Por otro lado, los resultados del mes de Ago-09 además de mostrar diferencias entre ploidías, mostraron una disminución de las medias para la biomasa (Fig. 29) en ambas ploidías. En este mes los diploides, como ya se había mencionado, se encontraron en estadio de desove y post-desove, por lo que una disminución de su crecimiento puede deberse al gasto energético realizado para esta parte final de la reproducción, aunado al hecho que en el mes de Ago-09 se observó la mayor temperatura promedio (28.9 °C) y la menor disponibilidad de alimento (0.49 mg clorofila-*a* m<sup>-3</sup>) (Fig. 30). Aunque los organismos triploides no estarían utilizando energía para la reproducción al ser estériles, también se observó una ligera disminución en su crecimiento, lo que nos permite inferir que las condiciones ambientales, como las altas temperaturas y el poco alimento disponible afectó su crecimiento, aunque en menor medida que los diploides, quienes adicionalmente llevaron el proceso de gameto-, vitelogénesis y desove entre Jun-09 y Ago-09. En otros estudios con moluscos crecidos bajo condiciones ambientales físicas no estresantes se ha observado que existe una movilización de reservas para la gameto- y vitelogénesis en diploides, movilización que no ocurre en triploides. Por ejemplo, Allen y Downing (1986) sin diferenciar entre tejidos, muestran que los diploides de *C. gigas* durante el desove sufren una disminución de glucógeno mientras que los triploides, al ser parcialmente

estériles, solo muestran una mínima utilización de este componente de reserva; Maguire *et al.* (1995) al igual que los autores anteriores, comprueban que los triploides de *C. gigas* mantienen sus reservas de glucógeno, mientras que los diploides las utilizan durante el desove. Por otro lado, cuando las condiciones ambientales son estresantes, como cuando las temperaturas son elevadas, también se han observado diferencias en componentes bioquímicos. Por ejemplo, en la misma especie que antes y al igual que los otros autores, Shpigel *et al.* (1992) encontraron que a altas temperaturas (30°), cuando la mayoría de los diploides estaban totalmente maduros y los triploides estériles, estos últimos presentaron altos niveles de proteínas y carbohidratos en comparación a los diploides. Contrario a lo anterior, en el pectínido *A. ventricosus* Ruíz-Verdugo *et al.* (2000; 2001b) reportan que no se observó una evidente utilización de las reservas del músculo aductor en diploides ni triploides, sugiriendo que esto fue debido a la utilización del alimento presente en el medio de cultivo durante los meses de gametogénesis, ya que además observaron una disminución en el peso del músculo aductor en ambas ploidías cuando los organismos se encontraron en condiciones de mayores temperaturas y baja productividad. Estos resultados sugieren que la utilización de reservas energéticas depende principalmente de la disponibilidad de alimento a la cual sean crecidos los organismos (Racotta *et al.*, 2008).

Mientras que los estudios de crecimiento, esterilidad y uso de reservas energéticas en moluscos triploides han permitido establecer la asociación entre los mismos para explicar las posibles causas del mejor crecimiento en triploides, no permiten entender algunos de los mecanismos moleculares involucrados en el control del crecimiento muscular entre diploides y triploides. Por ejemplo, se desconoce cuál es el papel de genes específicos, como el de la *MSTN* o su proteína la *MSTN*, cuyo papel en el control del crecimiento muscular es conocido en vertebrados. Con fines de lograr un mejor entendimiento del papel que la expresión del gen de la *MSTN* tiene en la almeja mano de león *N. subnodosus*, y conocer si este gen tiene una relación con la regulación del crecimiento en esta especie independientemente de la ploidía, fue necesario primero aislar la secuencia de este gen para esta especie a partir de organismos diploides. El transcrito aislado permitió establecer el sitio de expresión en las células del músculo aductor, así como saber cuáles son los tejidos donde este gen se expresa, adicionalmente del músculo aductor.

## 8.2. Localización muscular y expresión diferencial tisular del gen de la *miostatina* en diploides y triploides

La secuencia parcial del gen de la *miostatina* de *N. subnodosus* caracterizada en el presente estudio, fue comparada con las secuencias ya existentes de otros pectínidos como *A. irradians* y *C. farreri* (Kim *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2010). Para una mejor comparación estructural la secuencia fue traducida *in silico* a proteína. La secuencia del dominio N-terminal del propéptido, característica de la superfamilia de los Factores Transformantes del Crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), es conocida como la parte del péptido asociado a la latencia (LAP) (Miyazono *et al.*, 1988; Saharinen *et al.*, 1996; Munger *et al.*, 1997). Esto es, ha sido demostrado *in vivo* e *in vitro* que el propéptido inhibe la actividad biológica de la *MSTN*, manteniendo a la proteína en estado inactivo o de latencia (Lee y McPherron, 2001; Thies *et al.*, 2001; Wolfman *et al.*, 2003) hasta que esta es separada del dominio C-terminal por el sitio de procesamiento proteolítico (RXXR) (Lee, 2004). Este sitio de proteólisis es 100% similar (RSKR) entre la *miostatina* en *N. subnodosus* y las otras dos especies de pectínidos *A. irradians* y *C. farreri* reportadas en la literatura (Kim *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2010) con las que mostró una alta similitud principalmente en el dominio C-terminal. Este dominio, que es la parte biológicamente activa de la proteína, explica la alta similitud entre las especies de pectínidos. En esta secuencia se encontraron siete de las nueve cisteínas que muestran un patrón altamente conservado de este gen entre las diferentes especies de vertebrados (Thomas *et al.*, 2000) e invertebrados como los crustáceos *Gecarcinus lateralis* (Covi *et al.*, 2008) y *Pandalopsis japonica* (Kim *et al.*, 2010), además de los pectínidos ya mencionados. Por lo anterior se puede inferir una funcionalidad altamente conservada del gen de la *MSTN* como un regulador negativo del crecimiento muscular como ha sido descrito (McPherron y Lee, 1997; Thomas *et al.*, 2000; Dominique y Gérard, 2006), posiblemente debido a que este gen ha sido sometido a un alto nivel de selección estabilizadora que le ha permitido mantener su función, como ha sido sugerido por Pies y Alvares (2006). Adicionalmente, la secuencia parcial de la *miostatina* en *N. subnodosus* muestra varias inserciones (~8 aminoácidos) que ya habían sido reportadas en los otros dos pectínidos (Kim *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2010) y solo una inserción en crustáceos (Covi *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010). Hu *et al.* (2010) mencionan que estas inserciones pueden estar

relacionadas con una función diferente que la *miostatina* pudiese tener entre vertebrados e invertebrados, aunque tal posible función no es conocida.

Una vez identificado el gen de la *miostatina* en *N. subnodosus*, en el presente estudio se localizó el transcrito de la misma (*nsMSTN*) por metodologías de hibridación *in situ* (ISH) en el músculo aductor. Se observó la señal del transcrito de la *nsMSTN* sobre las fibras o células del músculo estriado las cuales debido a que se encontraron en un plano longitudinal, permiten inferir que el transcrito de este gen se localiza en el sarcoplasma de estas células. Este mismo patrón de localización de la *MSTN* en el sarcoplasma de las fibras musculares ha sido reportado previamente en salmón del Atlántico *S. salar*, por Østbye *et al.* (2001), quienes determinaron por inmunohistoquímica la presencia de la *MSTN* en el sarcoplasma de las fibras del músculo rojo y blanco de esta especie. Otros autores han buscado diferenciar el tipo de fibras específicas en las cuales se expresa este gen. Por ejemplo, Patruno *et al.* (2008) determinan por ISH que el transcrito de la *MSTN* está presente o localizado en ambas, las fibras del músculo rojo y del músculo blanco del pez *Dicentrarchus labrax*, aunque al confirmar por qPCR en estadio adulto encuentran que esta expresión es mayor en músculo rojo, el cual presenta un crecimiento más lento que el músculo blanco, pero que en estadio juvenil no hay diferencias cuantitativas de expresión de este gen en ambos tipos de tejido muscular. La mayor inmunoreactividad debido a la presencia de la *MSTN* en músculo rojo también fue observado por Radaelli *et al.* (2003) en juveniles y adultos de los peces *Sparus aurata*, *Solea solea* y *Brachydanio rerio*, mostrando una consistente diferencia en el patrón de expresión de este gen entre ambos estadios del ciclo de vida para las tres especies. En este punto es importante mencionar que en las especies de peces diploides y triploides estudiados a la fecha, los triploides no presentan una ventaja en crecimiento sobre los diploides y su utilización principal en la acuicultura es con fines de contención de gametos por la esterilidad causada (Benfey, 2001; Hulata, 2001). En peces, el único estudio comparando la expresión de la *MSTN* por inmunohistoquímica entre diploides y triploides es el de Radaelli *et al.* (2010), quienes no observan diferencias en la señal de la *MSTN* entre diploides y triploides de *D. labrax*, así como tampoco encuentran diferencias en crecimiento entre diploides y triploides.

Con los presentes resultados podemos concluir que la transcripción de este gen en *N. subnodosus* se lleva a cabo en las fibras o células del músculo estriado, aunque se desconoce si también se transcribe en músculo liso, ya que este no fue evaluado en el presente estudio. Mientras que la señal del transcrito de la *nsMSTN* en el presente trabajo fue visiblemente más clara en las fibras musculares de los organismos triploides, esto fue posiblemente debido a que las células de estos organismos tienen un mayor diámetro o grosor que el de los diploides como se observó en este trabajo y ha sido reportado en otro estudio con organismos triploides de otro pectínido, *A. ventricosus* (Palacios *et al.*, 2004). Hasta el momento, en invertebrados sólo se han realizado estudios de localización del transcrito en la anémona *Nematostella vectensis* (Saina y Technau, 2009), no encontrando al mismo en tejido muscular, por lo que el presente trabajo es el primero en identificar *in situ* este transcrito en músculo de una especie de invertebrado, y específicamente un molusco pectínido.

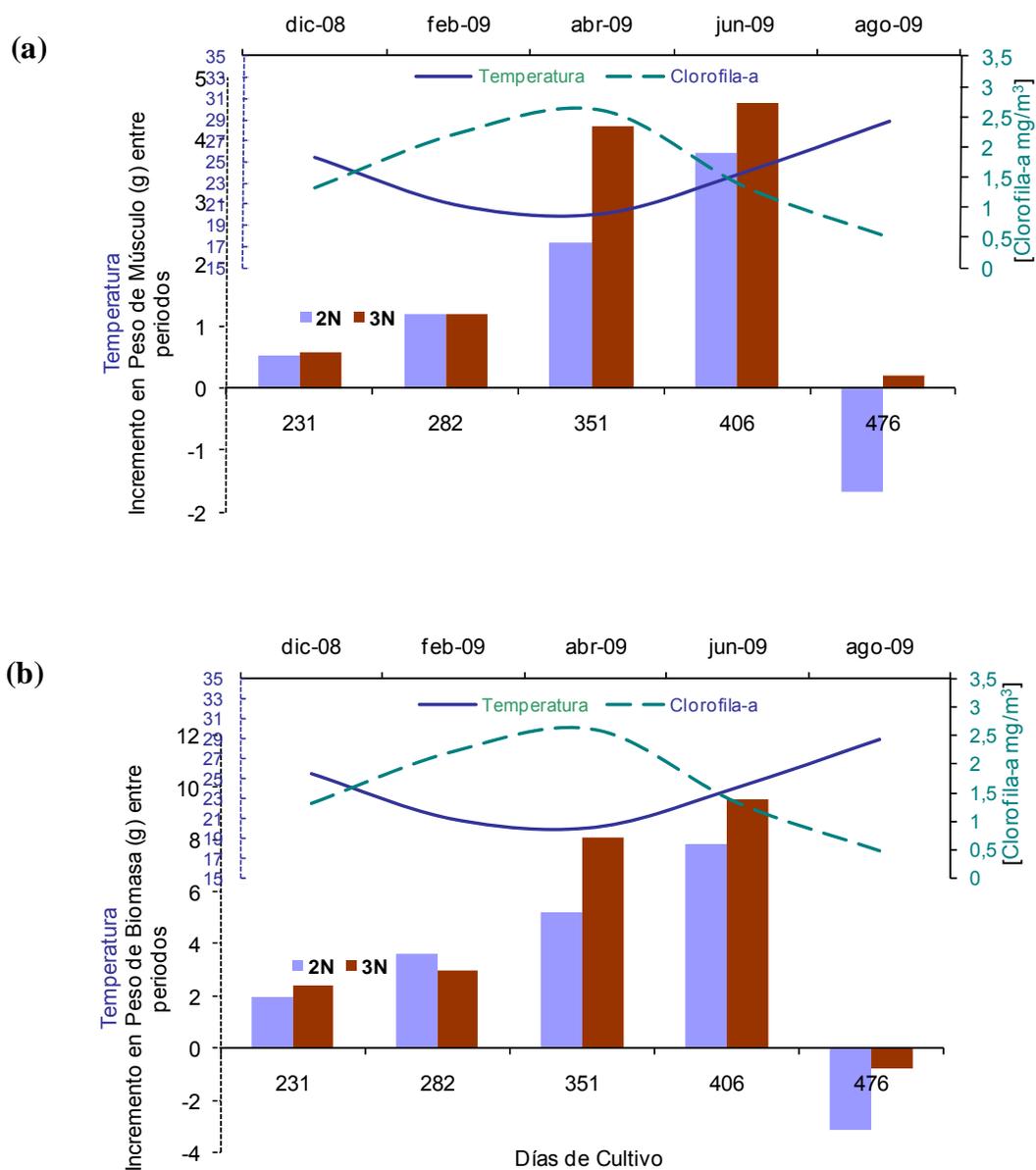
Adicionalmente a localizar por *ISH* el sitio de expresión en fibras del músculo aductor, en el presente trabajo, se comprobó por qPCR una ubicuidad de la *nsMSTN* en otros tejidos de *N. subnodosus*, y a diferencia de lo reportado en los otros pectínidos estudiados a la fecha, los resultados indicaron que además del músculo aductor, este gen también se expresó en forma significativa en glándula digestiva y gónada. La ubicuidad de la *MSTN* ha sido reportada en diferentes especies de peces en condición sólo diploide (Rescan *et al.*, 2001; Gregory *et al.*, 2004; Garikipati *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2006; Helterline *et al.*, 2007; Patruno *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008), en los cuales se ha encontrado que la *MSTN* se expresa en otros tejidos adicionalmente al músculo, tales como branquias, cerebro, corazón, riñones, intestino, estómago, gónadas, ojos y piel. Por otro lado, en moluscos pectínidos se ha reportado que es en el músculo aductor (Kim *et al.*, 2004), y más específicamente en el músculo estriado y no en el liso (Hu *et al.*, 2010), donde se presentan los mayores niveles del transcrito de la *MSTN*, seguidos por la expresión en tejidos como el manto, nefridio o riñón y branquia, y finalmente en tejidos como gónada y glándula digestiva con la menor expresión. En otros invertebrados como los crustáceos, los estudios realizados han mostrado que la expresión de la *MSTN* en tejido muscular está en función de la muda (Kim *et al.*, 2010; MacLea *et al.*, 2010), con la mayor expresión de la *MSTN* ocurriendo durante

la intermuda en el músculo (Covi *et al.*, 2008), además de observar la ubicuidad de la expresión de este gen en otros tejidos.

En la almeja *N. subnodosus* la expresión de la *nsMSTN* fue adicionalmente diferente entre diploides y triploides, tanto en músculo aductor a lo largo de las evaluaciones durante el crecimiento, así como en músculo, gónada y glándula digestiva durante la única evaluación entre tejidos en el mes de Ago-09, observándose una mayor expresión de la *nsMSTN* en los organismos diploides que en los triploides. Es importante mencionar que la fecha en la que se muestrearon estos tejidos, el mes de Ago-09, fue un mes en el cual como ya se ha mencionado se presentaron las mayores temperaturas promedio, la menor disponibilidad de alimento, así como el desove en los organismos diploides. En este mes el crecimiento de los organismos fue prácticamente negativo o nulo, en contraste con los meses anteriores, observándose una pérdida en peso de la biomasa (Fig. 29) en ambas ploidías, y del músculo aductor en los organismos diploides (Fig. 27). En el análisis de la expresión de la *nsMSTN* a diferentes edades, fue en este mismo mes de Ago-09 cuando se observó un incremento significativo en la expresión de este gen en ambas ploidías, aun siendo significativamente mayor en los diploides que los triploides. Estos resultados indican que el gen de la *miostatina* en *N. subnodosus* está involucrado no solamente en el control del crecimiento muscular, sino también en la respuesta al estrés como se discutirá a continuación.

El efecto que tiene el estrés, ya sea por maduración sexual o falta de alimento, sobre la expresión de la *MSTN* y la disminución del crecimiento muscular o atrofia muscular observada en diversas especies de peces ha sido estudiado por diversos autores. Por ejemplo, Terova *et al.* (2006) analizan la expresión de la *MSTN* en *D. labrax* durante la restricción de alimento y la realimentación, concluyendo que el ayuno induce un incremento en los niveles del transcrito de este gen, mientras que durante la realimentación se observa una disminución de su expresión acompañado de un crecimiento somático rápido. Sin embargo, el mecanismo por el cual la *MSTN* es inducida bajo condiciones de estrés no está claro, aunque los glucocorticoides han sido propuestos si no como inductores, al menos como indicadores. Por ejemplo, Vianello *et al.* (2003) proponen que la pérdida de

masa muscular que ocurre durante la maduración sexual y el lento crecimiento que se ha observado en condiciones de estrés por hacinamiento no es debido a los altos niveles de expresión de la *MSTN per se*, sino que los cambios en los niveles de *MSTN* son dependientes del persistente estado catabólico o escasamente anabólico del tejido muscular en peces, asociado al incremento de glucocorticoides tal como el cortisol. En otros trabajos, ha sido observada una relación de factores de crecimiento con glucocorticoides (Ottaviani *et al.*, 1997; 1998; 2001) demostrando la interacción de estas moléculas en la respuesta endocrina de diferentes invertebrados como moluscos insectos y anélidos. Así mismo, en vertebrados existen trabajos donde se ha encontrado que la atrofia presentada por altas dosis de glucocorticoides como el cortisol se asocia con elevados niveles de *MSTN* (Ma *et al.*, 2003; González-Cadavid y Bhasin, 2004; Gilson *et al.*, 2007). Este efecto ha sido observado también en invertebrados, específicamente en crustáceos donde Covi *et al.* (2010) observaron una correlación negativa entre la expresión de la *miostatina* y la síntesis de proteínas en el músculo de *G. lateralis* y por otro lado, observan atrofia muscular durante la muda, asociada con un incremento en los niveles de ecdisteroides.



**Figura 31.** Incrementos (y decremento) en peso de músculo aductor (a) y biomasa total (b) de *N. subnodosus* entre las edades evaluadas, con las variables ambientales de temperatura y clorofila-a registradas para Bahía de Loreto, B. C. Sur, para el periodo de tiempo evaluado. Tomado de Ramírez-Arce (2009).

A pesar de no existir estudios similares de ayuno o estrés en pectínidos en asociación con la expresión de la *MSTN* y la atrofia muscular, los estudios antes mencionados permiten inferir que el estrés causado por las condiciones de altas temperaturas y baja disponibilidad de alimento al cual estuvieron sometidos tanto los organismos diploides como triploides durante el verano (Ago-09), aunado a la condición de madurez sexual y desove en los diploides, están posiblemente relacionados con el observado incremento en la expresión de la *nsMSTN* en tejido muscular y otros tejidos observados tanto en diploides como en triploides. Tal estrés y la alta expresión de la *miostatina* observada este mes se asociaron paralelamente con una atrofia general, evidenciada por una disminución en peso de biomasa en ambas ploidías (Fig. 29) (que incluye todos los tejidos) y del peso del músculo aductor en los organismos diploides (Fig. 27).

Con respecto a la expresión de la *nsMSTN* en la glándula digestiva, es importante mencionar que se sabe que este órgano almacena componentes bioquímicos como los carbohidratos y los lípidos, los cuales son utilizados en la gametogénesis, o bien como reservas para las temporadas de baja disponibilidad de alimento para el mantenimiento de la actividad metabólica como se ha observado en especies de moluscos como *M. edulis* (Zarnoch y Schreiber, 2008). Así mismo, se ha reportado que existe una relación positiva del crecimiento de la glándula digestiva con el crecimiento del organismo por el almacenamiento de reservas (Domingues *et al.*, 2009), y este órgano se considera como uno secundario al músculo aductor para la acumulación de reservas energéticas (Sastry y Blake, 1971; Barber y Blake, 1985; Arellano-Martínez *et al.*, 2004). La elevada expresión de la *nsMSTN* en la glándula digestiva tanto en diploides como triploides aunque significativamente menor en los triploides contrasta con lo observado para otros pectínidos, ya que una elevada expresión de este gen en glándula digestiva no había sido reportada en los otros dos pectínidos diploides evaluados para la expresión tisular de la *MSTN* (Kim *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2010), para los cuales no se indica talla, etapa reproductiva o condiciones ambientales. Tal elevada expresión, y el que fuese mayor en diploides que triploides se puede asociar tanto a la esterilidad total en triploides (Ramírez-Arce, 2009), la baja disponibilidad de alimento y a que estos no fueron sometidos a un estrés y posible gasto energético adicional como lo fue el desove de los diploides. Aunque en el presente

estudio no se realizó la evaluación biométrica separada de la glándula digestiva, sí se observó un decremento en la biomasa total en el mes de Ago-09 para ambas ploidías (Fig. 29 y 31-b). Este decremento en peso de biomasa estuvo parcialmente asociado o fue causado por el decremento del peso del músculo aductor en diploides, pero dado que en los triploides no decreció, también se puede asociar con un decremento en peso de la glándula digestiva ya que el decremento en biomasa en diploides fue mayor que la pérdida de peso muscular (Fig. 27 y 31-a).

En contraste con tejido muscular, estudios evaluando la expresión del gen de la *miostatina* en gónada son escasos, por ejemplo, Kubota *et al.* (2007) encontraron que este gen se expresaba en testículo y ovario en gallinas durante la embriogénesis. El papel que la *MSTN* pueda tener en la gónada de la almeja adulta *N. subnodosus* se desconoce. Recientemente se ha encontrado que son las células de tipo muscular en el útero (células miométriales) las que expresan el gen de la *MSTN* en ratas y que la expresión del gen está en función del ciclo estral y responde a cambios en esteroides (Ciarmela *et al.*, 2009). En pectínidos, la gónada contiene tejido de tipo muscular disperso en la misma (datos no publicados, Llera, R. y A. M. Ibarra), y es posible que este tenga una función de regulación en su tamaño o masa en respuesta o asociación al desove y reabsorción.

En resumen, los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de la *nsMSTN* indican que existe una asociación entre una baja expresión de este gen y un mayor crecimiento observado en los organismos triploides, ya que fue en estos en donde se observó una menor expresión en comparación con los diploides para todas las edades y tejidos evaluados. Con estos resultados, particularmente la mayor expresión observada en los organismos diploides que en los triploides, y el mayor crecimiento en los triploides que diploides, se comprueba la función reportada para la *MSTN* en vertebrados: de regulador negativo del crecimiento (Grobet *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; McPherron y Lee, 1997; Gill *et al.*, 2008), lo cual ha sido comprobado previamente sólo por medio del silenciamiento de este gen en diferentes especies de vertebrados (Acosta *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005; Magee *et al.*, 2006). Por otro lado, se abre una nueva pregunta, ya que se desconoce qué controla o reduce la expresión de la *nsMSTN* en triploides, los cuales

cuentan con una dosis génica mayor que los diploides, pero la expresión de la *nsMSTN* fue consistentemente menor en estos. Una explicación para esta menor expresión de la *MSTN* en triploides es que este gen, por su característica de ser fuertemente regulado, depende para su expresión de una serie de elementos regulatorios o de control a su vez, y si alguno de esos no es compensado para la dosis extra en triploides, tal efecto pueda ser transmitido en la cadena regulatoria (Birchler *et al.*, 2007) impactando sobre la menor expresión de la *nsMSTN* observada en triploides. Finalmente, es importante mencionar que la alta variación inter-individual (Tichopard *et al.*, 2009; Vandesompele *et al.*, 2009; Kitchen *et al.*, 2010) en expresión génica podría ser reducida al utilizar *pools* de individuos cuando el objetivo es conocer diferencias entre tratamientos, por ejemplo ploidías, etapas consecutivas del crecimiento/desarrollo y tejidos, identificando aquellos genes de referencia que presenten la mayor estabilidad y evaluando el impacto de condiciones ambientales variables (temperatura y disponibilidad de alimento) en la estabilidad de la expresión génica de dichos genes de referencia. (Bustin *et al.*, 2009; Tichopard *et al.*, 2009; Vandesompele *et al.*, 2009; Artico *et al.*, 2010; Bustin *et al.*, 2010; De Santis *et al.*, 2010; Mallona *et al.*, 2010)

### **8.3. Hipertrofia sin hiperplasia, atrofia muscular, y componentes bioquímicos en músculo**

En el presente trabajo, adicionalmente a que los organismos triploides presentaron menores niveles de expresión de la *nsMSTN* que los diploides, se pudo comprobar la existencia de hipertrofia celular en los organismos triploides tanto en el mes de Jun-09 como en Ago-09 (Fig. 22), incrementándose de un mes a otro, contrario a lo observado en los diploides, para los cuales ocurrió una disminución del tamaño de las fibras musculares de Jun-09 a Ago-09. La hipertrofia en células musculares de organismos triploides había sido previamente observada por Johnston *et al.* (1999) en *S. salar* y en *A. ventricosus* por Palacios *et al.* (2004) sin observar diferencias entre ploidías en el número de fibras musculares. Por otro lado, Suresh y Sheehan (1998), no encuentran diferencias significativas en el tamaño y número de fibras musculares entre diploides y triploides de *Onchorynchus mykiss*, pero

mencionan que en los triploides se pudo observar una disminución en el número de fibras musculares del 10%. En *N. subnodosus* tanto el incremento en tamaño de las fibras en triploides como el decremento en diploides entre Jun-09 y Ago-09 fueron acompañados por un decremento en el número de fibras musculares en los triploides, indicando que ocurrió una atrofia muscular (Fig. 24). Esto es corroborado cuando se considera el área del músculo total (Fig. 25), y el valor estimado del número de fibras musculares en relación al área muscular (Fig. 26), ya que en el mes de Jun-09 los triploides presentaron un músculo ligeramente hipertrófico evidenciado por una tendencia a presentar una mayor área muscular en comparación con los diploides, lo cual fue probablemente causado por presentar un mayor tamaño de fibras que los diploides ya que el número de fibras musculares fue igual en ambas ploidías. Sin embargo, durante el mes de Ago-09, a pesar de observarse un incremento adicional en el tamaño de las fibras musculares en los triploides, la atrofia muscular fue de mayor grado que en los diploides debido principalmente al considerable decremento en el número de fibras musculares en los triploides en contraste con los diploides, evidenciado principalmente por el decremento en área de músculo.

La atrofia observada, o pérdida de fibras musculares en ambas ploidías, fue aparentemente compensada en los triploides con un incremento en el tamaño de las fibras, mientras que en los diploides el tamaño de las fibras musculares decreció. Sin embargo, aunque los diploides no presentaron una disminución significativa en el área muscular como los triploides, sí presentaron una pérdida significativa en el peso del músculo aductor en comparación a los triploides (Fig. 27). El no crecimiento y pérdida de fibras musculares en triploides y la pérdida de peso muscular en diploides observada en el mes de Ago-09, pudo ser una consecuencia de un estado catabólico en los organismos evaluados en Ago-09 en el presente estudio, principalmente por el uso de proteínas. Las proteínas son acumuladas durante el crecimiento, y cuando otros componentes bioquímicos como los carbohidratos y lípidos ya han sido utilizados (Barber y Blake, 1991), las proteínas son utilizadas para obtención de energía. En *N. subnodosus* Arellano-Martínez *et al.* (2004) mencionan que son las proteínas los componentes bioquímicos que se utilizan durante el desove o bien cuando las condiciones ambientales son deficientes, provocando la disminución del tamaño o peso muscular, tal como sucedió con los organismos diploides en

el presente estudio. Los resultados observados en el presente trabajo, particularmente los asociados con las condiciones ambientales estresantes encontradas durante el mes de Ago-09, indican que la disminución del número de fibras musculares y área/peso muscular de los individuos de ambas ploidías fue posiblemente producto de la utilización de proteínas.

Por otro lado, la atrofia observada a partir de la comparación entre ploidías para el número total de fibras por área muscular que fue aparentemente mayor en los triploides que en los diploides, no afectó en la misma magnitud el peso del músculo aductor (Fig. 27), ni el índice muscular (Fig. 28), ya que en los resultados se vio reflejada aún una ventaja en peso e índice muscular de los triploides sobre los diploides. La disminución del tamaño o atrofia del músculo aductor de los pectínidos diploides durante la gametogénesis (Barber y Blake, 1981; Epp *et al.*, 1988, Pazos *et al.*, 1997), así como la ventaja de tamaño muscular de los organismos triploides sobre los diploides durante el mismo periodo reproductivo (Ruíz-Verdugo *et al.*, 2001b; Ramírez-Arce, 2009), ya habían sido reportadas. Sin embargo, el mayor peso del músculo aductor de los triploides que los diploides observado en el presente trabajo, el cual ocurrió a pesar de paralelamente observarse una atrofia o pérdida de fibras musculares de mayor grado que en los diploides no ha sido previamente reportado. Ruíz-Verdugo *et al.* (2001b) encontraron que las diferencias en peso muscular entre diploides y triploides no estuvieron dadas por diferencias en contenido de agua por lo que es posible que en el presente trabajo tampoco lo estuvieron. Otra causa posible del mayor peso en los triploides puede ser por un alto contenido de lípidos, sin embargo no se observó un incremento significativo en lípidos entre Jun-09 y Ago-09. Por otro lado, otra causa pudo haber sido la presencia de una hipertrofia e hiperplasia sarcoplásmica. La hipertrofia sarcoplásmica es caracterizada por el crecimiento del sarcoplasma y de proteínas no contráctiles como la actina (Zatsiorsky y Kraemer, 2006), resultando en que las fibras musculares además de ser más anchas como se estableció en el presente trabajo, fuesen también más largas, lo cual podría explicar el mayor peso presentado por lo triploides en el mes de Ago-09 a pesar de que estos presentaron una menor área muscular que en Jun-09. Adicionalmente, un incremento en el número de fibras o hiperplasia en un plano longitudinal, o a lo largo del músculo, pueden haber ocurrido. Estudios previos han evaluado la longitud del músculo indirectamente, midiendo la convexidad dada por ambas valvas.

Por ejemplo, Ruíz-Verdugo *et al.*, (2000) encuentra que la convexidad de *A. ventricosus* fue de 22-24% mayor que la de los diploides y Ramírez-Arce (2009) observó diferencias significativas en convexidad entre diploides y triploides, en donde los triploides tuvieron una convexidad 8% mayor que los diploides, indicando una mayor longitud del músculo aductor en ambos casos. Dados los presentes resultados, la evaluación del número y el largo de los sarcómeros será necesaria a futuro para corroborar si los triploides presentan más fibras musculares longitudinalmente, y de mayor longitud que los diploides.

Adicionalmente a las características en número y tamaño de fibras musculares, en este trabajo se evaluaron dos componentes bioquímicos en músculo por técnicas histoquímicas y análisis de imágenes, lípidos y carbohidratos. Los resultados parecen no ser congruentes con la observada atrofia muscular particularmente en el mes de Ago-09, ya que fue durante este mes que se observó un ligero incremento en lípidos en triploides que resultaron diferencias significativas con los diploides y un incremento sustancial y significativo en carbohidratos en ambas ploidías (específicamente en glucógeno, que es lo que la técnica utilizada evalúa). Debido a que en el presente estudio se combinaron tanto la gametogénesis y el desove en diploides, como incrementos en la temperatura a la cual los organismos estuvieron sometidos, particularmente entre Jun-09 y Ago-09, así como la menor concentración de alimento disponible en el medio, un decremento en componentes bioquímicos en músculo en diploides sería esperado como ha sido observado previamente. En otros moluscos como *C. gigas* se ha observado que cuando estos son sometidos a altas temperaturas (de 8-15° C a 30°C) la concentración de carbohidratos disminuye, y una mayor concentración de glucógeno ocurre en triploides que en diploides (Shpigel *et al.*, 1992). Kong *et al.* (2007) encuentran que el contenido de glucógeno en organismos triploides de *C. gigas* es mayor que en los diploides durante el periodo de gametogénesis. En pectínidos, Ruíz-Verdugo *et al.* (2001b) observaron diferencias en carbohidratos en músculo de diploides y triploides de la almeja *A. ventricosus*, con los triploides presentando una mayor concentración de este componente durante el mes en que los diploides desovaron, observando también un decremento significativo de los carbohidratos en ambas ploidías pero con una tendencia a menor concentración en músculo de diploides, coincidiendo con el mes de octubre y con condiciones de temperatura elevada debido a la

presencia de El Niño durante esas evaluaciones. Por otro lado, Racotta *et al.* (2008) no encontraron diferencias significativas en carbohidratos del músculo aductor entre diploides y triploides de *N. subnodosus* cuando estos fueron crecidos en el mismo sitio. Los carbohidratos únicamente variaron estacionalmente, observándose un incremento en los mismos en músculo aductor en paralelo a la gametogénesis, y una disminución drástica en ambas ploidías a partir del mes que los diploides desovaron, lo cual fue acompañado de un decremento sustancial en peso del músculo aductor (Maldonado-Amparo *et al.*, 2004). Los resultados en el presente trabajo fueron similares a los observados por Racotta *et al.* (2008) en el hecho de no encontrar diferencias significativas entre diploides y triploides para carbohidratos en músculo. Sin embargo, difieren en el hecho de que los carbohidratos incrementaron más que decrecer en Ago-09, justo después del desove y cuando el peso del músculo no incrementó en triploides y decreció en diploides.

Al igual que los carbohidratos, los lípidos en músculo mostraron una tendencia a incrementar de Jun-09 a Ago-09, aunque tal incremento no alcanzó significancia estadística. Las diferencias principales fueron dadas por una mayor concentración de lípidos en triploides que diploides particularmente en Ago-09. Las diferencias en lípidos en músculo entre ploidías no serían esperadas si durante la gametogénesis los lípidos derivados de la glándula digestiva son utilizados primero que aquellos presentes en otros tejidos, como el músculo (Napolitano y Ackman, 1993). Este resultado es sorprendente ya que estudios previos entre diploides y triploides no han encontrado diferencias entre cantidad total o tipo de lípidos en músculo entre ploidías (Arjona *et al.*, 2008). Por otro lado, Racotta *et al.* (2008), cuando analizan tanto la fracción polar como la neutral de lípidos en el músculo aductor de *N. subnodosus*, encuentran diferencias significativas entre diploides y triploides únicamente para DHA (ácido docosaheptaenoico) en la fracción de lípidos polares, con los triploides presentando una mayor concentración que los diploides.

Los resultados obtenidos de la evaluación de los componentes bioquímicos en el presente trabajo, contrastantes con lo esperado son interesantes, ya que como fue mencionado en la introducción, posteriormente a la identificación del gen de la *MSTN* como un regulador del crecimiento y causante de la hipertrofia muscular en individuos

mutantes con nula o baja expresión del mismo, este gen ha sido identificado como un gen con importantes efectos metabólicos y fisiológicos. Por ejemplo, McPherron y Lee (2002) observan que una nula o baja expresión de la *MSTN* (por ejemplo, en mutantes) inhibe la acumulación de grasas, y una elevada expresión de la *MSTN* promueve su acumulación. Esto podría explicar el incremento en lípidos del músculo de Jun-09 a Ago-09 tanto en diploides como triploides, ya que fue en esos meses cuando la *MSTN* incrementó significativamente su expresión en ambas ploidías. Aún mas, en vertebrados, existe tejido adiposo intermuscular con adipocitos localizados entre fascículos musculares, el cual se ha demostrado que es inducido por la *MSTN* (Artaza *et al.*, 2005); la *MSTN* actúa sobre células satelitales en músculo para su diferenciación en adipocitos, los cuales expresan genes específicos de adipocitos y acumulan lípidos (Feldman *et al.*, 2006). Aun más, la presencia de adipocitos maduros en músculo ha sido asociada con condiciones patológicas o de estrés (Vettor *et al.*, 2009). Sin embargo, en pectínidos no existen estudios que identifiquen la posible presencia de células tipo adipocitos en músculo y debido a que la identificación de tejido adiposo interfibras es lograda principalmente utilizando otras técnicas que las utilizadas de histoquímica en el presente, tal identificación y estudio tendrá que ser realizado a futuro.

Otra característica de organismos mutantes para el gen de la *MSTN*, adicionalmente al incremento en tamaño muscular y a una reducción en lípidos musculares, es que la falta de esta proteína en mutantes se ha asociado con un incremento en la sensibilidad a la insulina y con un concomitante incremento en utilización de la glucosa, que se ha propuesto resulta en la menor concentración de triglicéridos o lípidos en adipocitos de músculo en organismos no expresando la *MSTN* (Guo *et al.*, 2009). Recientemente Chen *et al.* (2010) demostraron que la *MSTN* regula el consumo o almacenamiento de glucosa en los miotubos actuando sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la misma. Estos autores mencionan que el incremento de la *MSTN* activa la vía AMPK, la cual está estrechamente relacionada con el transporte de glucosa para restaurar el almacenamiento de energía en la célula en condiciones de estrés (Hayashi *et al.*, 2000). Esto nos permite proponer que el elevado incremento en la expresión de la *nsMSTN* observada en el mes de

Ago-09 en el presente estudio tanto en diploides como triploides, pudo inducir una elevada acumulación de glucógeno observada en dicho mes tanto en diploides como triploides.

Los resultados del presente trabajo nos permiten concluir que el papel que tiene la *MSTN* no se restringe a la regulación del crecimiento muscular *per se* en la almeja *N. subnodosus*, sino que también está relacionado con el control de genes asociados al almacenamiento y la utilización de las reservas energéticas, particularmente bajo condiciones de estrés. En este trabajo únicamente se evaluó el músculo aductor para componentes bioquímicos, y el papel que la *MSTN* pudiese tener en la regulación de componentes bioquímicos en otros órganos, como la glándula digestiva y la gónada, deberá ser evaluado a futuro en relación a cambios en la expresión de la *MSTN* en los mismos, así como bajo condiciones normales y de estrés nutricional y/o térmico.

## 9. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES

### 9.1. Conclusiones

- Existe una menor expresión de la *nsMSTN* en todos los tejidos de los organismos triploides de *N. subnodosus* en comparación con los diploides, incluyendo el músculo aductor, lo cual se asoció con el crecimiento diferencial de estas ploidías a lo largo de los meses evaluados.
- El gen de la *MSTN* en *N. subnodosus* se expresa en todos los tejidos de la almeja tal como se ha reportado en otras especies de invertebrados, pero la expresión observada en otros tejidos que el músculo aductor fue mayor que lo reportado previamente en pectínidos, particularmente en glándula digestiva y gónada bajo las condiciones ambientales en que se encontraban las almejas del presente estudio.
- Incrementos en la expresión de la *MSTN* se asocian directamente con condiciones de estrés y una atrofia muscular en *N. subnodosus*, evidenciada por la pérdida de fibras musculares y un decremento en tamaño del músculo.
- Los resultados indican que el crecimiento del tejido muscular y los componentes de reserva almacenados en el mismo podrían estar regulados mediante vías metabólicas en las cuales está involucrada directamente la *MSTN*.

## 9.2. Recomendaciones

- Evaluar la longitud del músculo aductor para corroborar si los triploides presentan fibras musculares de mayor longitud que los diploides.
- Validar múltiples genes de referencia en esta especie, tanto en diferentes tejidos como bajo diferentes condiciones ambientales/fisiológicas/metabólicas.
- Futuros estudios será necesario utilizar las guías MIQE propuestas recientemente (Bustin *et al.*, 2009; Bustin *et al.*, 2010) para la evaluación de la expresión génica a partir de ARN.
- Validar la cuantificación de componentes bioquímicos por píxeles utilizando técnicas bioquímicas ya estandarizadas.
- Cuantificar la concentración de proteínas presentes en músculo aductor para entender los procesos de hipertrofia/atrofia.
- Cuantificar la expresión de la *MSTN* en paralelo a la concentración de componentes bioquímicos en otros órganos o tejidos que el músculo aductor, y en condiciones normales y de estrés.
- Realizar análisis de expresión génica cuantitativa para otros genes con una función conocida en el crecimiento, como por ejemplo los receptores tipo activina, y el factor de crecimiento tipo insulina así como su receptor, con fines de comprender si estos otros genes presentan similarmente una expresión diferencial entre ploidías que pudiese explicar la regulación negativa de la *MSTN* observada en triploides.

## 10. LITERATURA CITADA

- Acosta, J., Y. Carpio, I. Borroto, O. González y M. P. Estrada. 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J. Biotechnol.* 119: 324-331.
- Adams, K. L. y J. F. Wendell. 2005. Novel patterns of gene expression in polyploid plants. *Trends Genet.* 21(10): 539-543.
- Adams, K. L. 2007. Evolution of duplicate gene expression in polyploid and hybrid plants. *J. Hered.* 98 (2):136–141.
- Allen, Jr. S. K. 1983. Flow cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish. *Aquaculture* 33: 317-328.
- Allen, Jr. S. K. y S. L. Downing. 1986. Performance of triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 102: 197-208.
- Allendorf, F. W. y R. F. Leary. 1984. Heterozygosity in gynogenetic diploids and triploids estimated by gene-centromere recombination rates. *Aquaculture* 43: 413-420.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Arellano-Martínez, M., I. S. Racotta, B. P. Ceballos-Vazquez y J. F. Elorduy-Garay. 2004. Biochemical composition, reproductive activity and food availability of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in the laguna ojo de liebre, Baja California Sur, Mexico. *J. Shellfish Res.* 23(1): 15-23.
- Arjona, O., A. Millan, A. M. Ibarra y E. Palacios. 2008. Muscle and roe lipid composition in diploid and triploid scallops. *J. Food Lipids* 15:407-419.
- Artaza, J. N., S. Bhasin, T. R. Magee, S. Reisz-Porszasz, R. Shen, N. P. Groome, M. M. Fareez y N. F. González-Cadavid. 2005. Myostatin inhibits myogenesis and promotes adipogenesis in C3H 10T(1/2) mesenchymal multipotent cells. *Endocrinology* 146(8):3547-3557.
- Artico, S., S. M. Nardeli, O. Brilhante, M. F. Grossi-de-Sa y M. Alvers-Ferreira. 2010. Identification and evaluation of new reference genes in *Gopssypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. *BMC Plant Biology* 10(49): 1471-2229.
- Auger, D. L., A. D. Gray, T. S. Ream, A. Kato, E. H. Coe, Jr. y J. A. Birchler. 2005. Nonadditive gene expression in diploid and triploid hybrids of maize. *Genetics* 169: 389-397.
- Barber, B.J. y Blake, N.J. 1981. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 52, 121-134

- Barber, B. J. y N. J. Blake. 1985. Intra-organ biochemical transformations associated with oogenesis in the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* (Say), as indicated by  $^{14}\text{C}$  incorporation. *Biol. Bull.* 168: 39-49.
- Barber, B. J. y N. J. Blake. 1991. Reproductive physiology. In: Shumway, S. E. (Ed) *Scallops: biology, ecology and aquaculture*. Elsevier, West Boothbay Harbor. 377-428.
- Beaumont, A. R., J. E. Fairbrother y K. Hoare. 1995. Multilocus heterozygosity and size: a test of hypotheses using triploid *Mytilus edulis*. *Heredity* 75: 256-266.
- Benfey, T. J. 2001. Use of sterile triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* Lj.) for aquaculture in New Brunswick, Canada. *ICES J. Mar. Sci.* 58: 525-529.
- Benson, D. A., M. I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell y D. L. Wheeler. 2004. GenBank. *Nucl. Acids Res.* 32 Database issue
- Birchler, J. A., H. Yao y S. Chudalayandi. 2007. Biological consequences of dosage dependent gene regulatory systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1769(5-6):422-428.
- Brokordt, K. y H. E. Guderley. 2004. Energetic requirements during gonad maturation and spawning in scallops: sex differences in *Chlamys islandica* (Müller 1776). *J. Shellfish Res.* 23 (1): 25-32.
- Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele y C. T. Wittwer. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55(4): 611-622.
- Bustin, S. A. 2010. Why the need for qPCR publication guidelines?-The case for MIQE. *Methods* 50: 217-226.
- Carlson, B. M. 2007. *Principles of regenerative biology*. Academic Press. USA. 379 pp.
- Castro-Gago, M. C. Gómez-Lado, J. Eiris-Puñal, I. Carneiro, V. M. Arce y J. Devesa. 2007. Muscle myostatin expression in children with muscle diseases. *J. Child Neurol.* 22: 38-40.
- Chang, P. L., N. Georgiadis, G. I. Joubert y R. G. Davidson. 1983. Gene dosage effects in human diploid and tetraploid fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 145: 277-284.
- Charlier, C., W. Coppieters, F. Farnir, L. Grobet, P. L. Leroy, C. Michaux, M. Mni, A. Schwers, P. Vanmanshoven, R. Hanset y M. Georges. 1995. The *mh* gene causing double-muscling in cattle maps to bovine chromosome 2. *Mamm. Genome* 6: 788-792.
- Chelh, I., B. Meiner, B. Picard, M. J. Reecy, C. Chevalier, J. F. Hocquette e I. Cassar-Malek. 2009. Molecular profiles of quadriceps muscle in myostatin-null mice reveal P13K and apoptotic pathways as myostatin targets. *BMC Genomics* 10:196.

- Chen, Y., J. Ye, L. Cao, Y. Zhang, W. Xia y D. Zhu. 2010. Myostatin regulates glucose metabolism via the AMP-activated protein kinase pathway in skeletal muscle cells. *IJBCB* 42:2072-2081.
- Ciarmela, P., E. Wiater, S. M. Smith y W. Vale. 2009. Presence, actions, and regulation of myostatin in rat uterus and myometrial cells. *Endocrinology* 150(2):906-914.
- Colussi, C., C. Gaetano y M. C. Capogrossi. 2008. Follistatin strikes back at muscular dystrophy. *Gene Therapy* 15:1075-1076.
- Covi, J. A., H. W. Kim y D. L. Mykles. 2008. Expresión of alternatively sílices transcripts fora a myostatin-like protein in the blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 150: 423-430.
- Covi, J. A., B. D. Bader, E. S. Chang y D. L. Mykles. 2010. Molt cycle regulation of protein synthesis in skeletal muscle of the blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*, and the differential expression of a myostatin-like factor during atrophy induced by molting or unweighting. *J. Exp. Biol.* 213: 172-183.
- De Santis, C., C. Smith-Keune y D. F. Jerry. 2010. Normalizing RT-qPCR data: are we getting the right answers? An appraisal of normalization approaches and internal reference genes from a case study in the finfish *Later calcarifer*. *Mar. Biotech.* DOI 10.1007/s10126-010-9277-z
- Domingues, P. M., L. Marquez, N. Lopez y C. Rosas. 2009. Effects of food thermal treatment on growth, absorption and assimilation efficiency of juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Aquac. Inter.* 17:283-299.
- Dominique, J. E. y C. Gérard. 2006. Myostatin regulation of muscle development : Molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp. Cell Res.* 312: 2401-2414
- Du, S. J. 2004. Molecular regulation of fish muscle development and growth. En: *Fish development and genetics: The zebrafish and medaka models*. Eds: Gong, Z. y V. Korzh. Molecular aspects of fish and marine biology. Vol. 2. 337-397.
- Enríquez-Díaz, M. R. 2004. Variabilidad y bioenergética de la reproducción del ostión *Crassostrea gigas*. Tesis de doctorado. Université de Bretagne Occidentale. 193 pp.
- Epp, J., V. M. Bricelj y R. E. Malouf. 1988. Seasonal partitioning and utilization of energy reserves in two age classes of the bay scallop *Argopecten irradians irradians* (Lamarck). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 121(2): 113-136.
- Epstein, C. J. 1967. Cell size, nuclear content and the development of polyploidy in the mammalian liver. *Zoology* 57: 327-334.
- Feldman, B. J., R. S. Streeper, R. V. Farese Jr. y K. R. Yamamoto. 2006. Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(42):15675-15680.

- Félix-Pico, E. F., M. Villelejo-Fuerte, A. Tripp-Quezada y O. Holguín-Quiñones. 1999. Growth and survival of *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1835) in suspended culture at the nacional marine park of Bahía de Loreto, B. C. S. México. Book of Abstracts 12<sup>th</sup> International Pectinid Workshop, Bergen, Norway 39-40 p.
- Gálvez-Gastelum, F. J., A. S. Sandoval-Rodríguez y J. Armendáriz-Borunda. 2004. El factor de crecimiento transformante  $\beta$  como blanco terapéutico. *Sal. Pub. Mex.* 46(4): 341-350.
- Garikipati, D. K., S. A. Gahr y B. D. Rodgers. 2006. Identification, characterization and quatitative expression analysis of rainbow trout myostatin-1a and myostatin-1b genes. *J. Endocrinol.* 190: 879-888.
- Garnier-Géré, P. H., Y. Naciri-Graven, S. Bougrier, A. Magoulas, M. Héral, G. Kotoulas, A. Hawkins y A. Gérard. 2002. Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in contrasting natural environments. *Mol. Ecol.* 11: 1499-1514.
- Gill, J. L., S. C. Bishop, C. McCorquodale, J. L. Williams y P. Wiener. 2008. Associations between the 11-bp deletion in the myostatin gene and carcass quality in Angus-sired cattle. *Anim. Genet.* 40 (1): 97-100.
- Gilson, H., O. Schakman, L. Combaret, P. Lause, L. Grobet, D. Attaix, J. M. Ketelslegers y J. P. Thissen. 2007. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology* 148(1):452-460.
- Glass, D. J. 2003. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat. Cell Biol.* 5: 87-90.
- González-Cadavid, N. F., W. E. Taylor, K. Yarasheski, I. Sinha-Hikim, K. Ma, W. Ezzat, R. Shen, R. Lalani, S. Asa, M. Mamita, G. Nair, S. Arver y S. Bhasin. 1998. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:14938-14943.
- González-Cadavid, N. F. y S. Bhasin. 2004. Role of myostatin in metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nut. Metab. Care* 7: 451-457.
- Gregory, D. J., G. C. Waldbieser y B. G. Bosworth. 2004. Cloning and characterization of myogenic regulatory genes in three Ictalurid species. *Anim. Genet.* 35: 425-430.
- Grobet, L., L. J. Royo-Martin, D. Poncelet, D. Pirottin, B. Brouwers, J. Riquet, A. Schoeberlein, S. Dunner, F. Ménissier, J. Massabanda, R. Fries, R. Hanset y M. Georges. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-musced phenotype in cattle. *Nature Genet.* 17: 71-74.
- Guo, X., W. K. Hershberger, K. Cooper y K. Chew. 1992. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: II. Segregation of Chromosomes. *Biol. Bull.* 183: 387-393.
- Guo, X. y S. K. Allen, Jr. 1994. Sex determination and polyploid gigantism in the dwarf surfclam (*Mulinia lateralis* Say). *Genetics* 138: 1199-1206.

- Guo, M., D. Davis y J. A. Birchler. 1996. Dosage effects of gene expression in a maize ploidy series. *Genetics* 142: 1349-1355.
- Guo, T., W. Jou, T. Chanturiya, J. Portas, O. Gavrilova y A. C. McPherron. 2009. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. *PLoS ONE* 4(3): e4937 doi:10.1371/journal.pone.0004937
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hanset, R. y C. Michaux. 1985. On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed. I. Experimental data. *Gen. Sel. Evol.* 17(3): 359-368.
- Hasselgren, P. O. 1999. Glucocorticoids and muscle catabolism. *Curr. Opin. Clin. Nut. Metab. Care* 2(3): 201-205.
- Hawke, T. J. y D. J. Garry. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular basis. *J. App. Phys.* 91:534-551
- Hayashi, T., M. F. Hirshman, N. Fujii, S. A. Habinowski, L. A. Witters y L. J. Goodyear. 2000. Metabolic stress and altered glucose transport activation of AMP-Activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. *Diabetes* 49:1-5.
- Helterline, D. L. I., D. Garikipati, D. L. Stenkamp y B. D. Rodgers. 2007. Embryonic and tissue-specific regulation of myostatin-1 and -2 gene expression in zebrafish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 151(1):90-97.
- Herpin, A., C. Lelong y P. Favrel., 2004. Transforming growth factor- $\beta$ -related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev. Comp. Immunol* 28: 461-485.
- Hill, J. J., M. V. Davies, A. A. Pearson, J. H. Wang, R. M. Hewick, N. M. Wolfman y Y. Qiu. 2002. The myostatin propeptide and the Follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol. Chem.* 277(43): 40735-40741.
- Hu, W. S. 2004. Protocol for preparing poly-L-lysine slides for microarrays. Department of Chemical Engineering and Materials Science. University of Minnesota. [http://hugroup.cems.umn.edu/Protocols/preparing\\_slides.pdf](http://hugroup.cems.umn.edu/Protocols/preparing_slides.pdf)
- Hu, X., H. Guo, Y. He, S. Wang, L. Zhang, S. Wang, X. Huang, S. W. Roy, W. Lu, J. Hu y Z. Bao. 2010. Molecular characterization of Myostatin gene from zhikong scallop *Chlamys farreri* (Jones et Preston 1904). *Gene. Genet. Syst.* 85: 207-218.
- Hulata, G. 2001. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica* 111: 155-173.
- Ibarra, A. M. 2006. Propuesta de investigación aplicada, CONVOCATORIA SEMARNAT 2006-01: Modelo biológico para alcanzar un balance entre la conservación y el aprovechamiento sustentable de los recursos marino en reseras y parques naturales.

- Caso de estudio: almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*). Fondo S0010. Convocatoria S0010-2006-1. Solicitud 23397.
- Ibarra, A. M. y J. L. Ramírez. 2008. Manual Práctico. Inducción a la triploidía con Citocalacina-B en Ostión Japonés, *Crassostrea gigas*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. (CIBNOR) La Paz, B. C. S., México. 19 pp.
- Johnston, I. A., G. Strugnell, M. L. McCracken y R. Johnstone. 1999. Muscle growth and development in normal-sex-ratio and all-female diploid and triploid Atlantic salmon. *J. Exp. Biol.* 202: 1991-2016.
- Kambadur, R., M. Sharma, T. P. L. Smith y J. J. Bass. 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* 7: 910-915.
- Keen, A.M., 1971. *Sea Shells of Tropical West America. Marine Mollusks from Baja California to Perú*. Stanford University Press, Stanford. 1065 pp.
- Kerr, T., E. H. Roalson y B. D. Rodgers. 2005. Phylogenetic analysis of the myostatin gene sub-family and the differential expression of a novel member in zebrafish. *Evol. Dev.* 7(5): 390-400.
- Kim, H-W. y D. L. Mykles, F. W. Goetz y S. B. Roberts. 2004. Characterization of a myostatin-like gene from the bay scallop, *Argopecten irradians*. *Biochim. Biophys. Acta* 1679: 174-179.
- Kim, K. S., Y. J. Kim, J. M. Jeon, Y. S. Kang, Y. S. Kang, C. W. Oh y H. W. Kim. 2010. Molecular characterization of myostatin-like genes expressed highly in the muscle tissue from Morotog shrimp, *Pandalopsis japonica*. *Aquacult. Res.* 41(11): e862-e871.
- Kitchen, R. R., M. Kubista y A. Tichopard. 2010. Statistical aspects of quantitative real-time PCR experiment design. *Methods* 50:231-236.
- Ko, C. F., T.T. Chiou, T. T. Chen, J. L. Wu, J. C. Chen y J. K. Lu. 2007. Molecular cloning of myostatin gene and characterization of tissue-specific and developmental stage-specific expression of the gene in orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Mar. Biotech.* 9:20-32.
- Kollias, H. D y J. C. McDermott. 2008. Transforming growth factor- $\beta$  and myostatin signaling in skeletal muscle. *J. App. Physiol.* 104: 579587.
- Kong, L., Z. Wang, R. Yu, Q. Li y R. Wang. 2007. Seasonal variation of the glycogen enzyme activity in diploid and triploid pacific oyster gonad during sexual maturation. *J. Ocean Univ. China* 6(4): 383-386.
- Kubota, K., F. Sato, S. Aramaki, T. Soh, N. Yamauchi y M. Hattori. 2007. Ubiquitous expression of myostatin in chicken embryonic tissues: its high expression in testis and ovary. *Comp. Biochem. Physiol. A* 148, 550-555.
- Lang, C. H., C. Silvis, G. Nystrom y R. A. Frost. 2001. Regulation of myostatin by glucocorticoids after thermal injury. *FASEB J.* 15: 1807-1815

- Langley, B. M. Thomas, A. Bishop, M. Sharma y S. Gilmour. 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J. Biol. Chem.* 277(51): 49831-49840.
- Lee, S-J. y A. C. McPherron. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.*98(16): 9306-9311.
- Lee, S-J. 2004. Regulation of muscle mass by myostatin. *Ann. Rev. Cell Dev. Bi.* 20:c61-86.
- Lillie, R. D. 1965. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. 3rd Ed. McGraw-Hill. New York. 942 pp.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-2\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25: 402–408.
- Ma, K., C. Mallidis, S. Bhasin, V. Mahabadi, J. Artaza, N. González-Cadavid, J. Arias y B. Salehian. 2003. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expresión. *Am. J. Physiol-Endoc. M.* 285: E363-E371.
- MacLea, K. S., J. A. Covi, H. W. Kim, E. Chao, S. Medler, E. S. Chang y D. L. Mykles. 2010. Myostatin from the American lobster, *Homomarus americanus*: Cloning and effects of molting on expression in skeletal muscles. *Comp. Biochem. Physiol. A* 1-10.
- Magge, T. R., J. N. Artaza, M. G. Ferrini, D. Vernet, F. I. Zúñiga, L. Cantina, S. Reisz-Porszasz, J. Rajfer y N. F. González-Cadavid. 2006. Myostatin short interfering hairpin RNA gene transfer increases skeletal muscle mass. *J. Gene Med.* 8 (9):1171-1181.
- Maguire, G. B., N. C. Gardner, J. A. Nell, G. N. Kent y A. S. Kent. 1995. Studies on triploid oysters in Australia. 2. Growth condition index gonad area and glycogen content of triploid and diploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, from oyster leases in Tasmania, Australia. *Aquaculture* 137:355-358.
- Maldonado-Amparo, R. y A. M. Ibarra. 2002a. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in diploid and triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842). *J. Shell. Res.* 21, 93–101.
- Maldonado-Amparo R. y A. M. Ibarra. 2002b. Comparative analysis of oocyte type frequencies in diploid and triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) as indicators of meiotic failure. *J. Shell. Res.*21, 597–603.
- Maldonado-Amparo, R., J. L. Ramírez, S. Avila y A. M. Ibarra. 2004. Triploid lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby); growth, gametogenesis, and gametic cell frequencies when growth at a high food availability site. *Aquaculture* 235, 185-205.
- Mallona, I., S. Lischewski, J. Weiss, B. Hause y M. Egea-Cortines. 2010. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biol.* 10(4): 1471-2229.

- Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, F. Chitsaz, M. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, J. H. Fong, L. Y. Geer, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, F. Lu, S. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, J. S. Song, A. Tasneem, N. Thanki, R. A. Yamashita, D. Zhang, N. Zhang y S. H. Bryant. 2008. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucl. Acids Res.* 37: D205-D210.
- McCroskery, S. M. Thomas, L. Maxwell, M. Sharma y R. Kambadur. 2003. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J. Cell Biol.* 162(6): 1135-1147.
- McPherron, A. C. A. M. Lawler y S-J. Lee. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature* 387, 83-90.
- McPherron, A. C. y S-J, Lee. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 12457-12461.
- McPherron, A. C. y S-J, Lee. 2002. Supresión of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J. Clin. Inv.* 109(5): 595-601.
- Miyazono, K., U. Hellman, C. Wernstedt y C-H. Heldin. 1988. Latent high molecular weight complexo f transforming growth factor  $\beta$ 1. *J. Biol. Chem.* 263(13): 6407-6415.
- Morales-Hernández, R. y C. Cáceres-Martínez. 1996. Pesquería de almeja mano de León *L. subnodosus*. En : M. Casas y G. Ponce (Ed). Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Vol. I. SEMARNAP. FAO. INP. UABCS. CIBNOR. CICIMAR. UECYTM. La Paz, B. C. S., México. 87-100 p.
- Mosher, D. S., P. Quignon, C. D. Bustamante, N. B. Sutter, C. S. Mellersh, H. G. Parker y E. A. Ostrander. 2007. A mutations in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLOS Genetics* 3(5), 779-786.
- Munger, J. S., J. G. Harpel, P-E. Gleizes, R. Mazziere, I. Nunes y D. B. Rifkin. 1997. Latent transforming growth factor- $\beta$ : Structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int.* 51: 1376-1382.
- Napolitano, G.E. y R. G. Ackman. 1993. Fatty acid dynamics in sea scallops *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791) from Georges Bank, Nova Scotia. *J. Shell. Res.* 12:267-277.
- Osborn, T. C., J. C. Pires, J. A. Birchler, D. L. Auger, Z. J. Chen, H-S, Lee, L. Comai, A. Madlung, R. W. Doerge, V. Colot y R. A. Martienssen. 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trend Genet.* 19 (3), 141-147.
- Østbye, T. K., T. F. Galloway, C. Nielsen, I. Gabestad, T. Bardal y O. Andersen. 2001. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *Eur. J. Biochem.* 268(20): 5249-5257.

- Osuna-García, M., A. Hernández-Llamas y J. M. Mazón-Suástegui. 2008. Production dynamics of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus* cultivated off-bottom. *Aquaculture* 274: 260-267.
- Otsu, N. 1979. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE. Trans. Systems, Man, and Cybernetics*. 9(1): 62-66.
- Ottaviani, E., E. Caselgrandi y D. Kletsas. 1997. Effect of PDGF and TGF- $\beta$  on the release of biogenic amines from invertebrate immunocytes and their possible role in the stress response. *FEBS Lett.* 403(3): 236-238.
- Ottaviani, E., E. Caselgrandi y D. Kletsas. 1998. The CRH-ACTH-biogenic amine axis in invertebrate immunocytes activated by PDGF and TGF- $\beta$ . *FEBS Lett.* 427(2): 255-258.
- Ottaviani E, A. Franchini y D. Kletsas. 2001. Platelet-derived growth factor and transforming growth factorbeta in invertebrate immune and neuroendocrine interactions: another sign of conservation in evolution. *Comp. Biochem. Physiol C* 9: 295-306.
- Owens, G. K. P. S. Rabinovitch y S. M. Schwartz. 1981. Smooth muscle cell hypertrophy versus hyperplasia in hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78 (12), 7759-7763.
- Palacios, E., I. S. Racotta, A. M. Ibarra, J. L. Ramírez, A. Millán y S. Ávila. 2004. Comparison of biochemical composition and muscle hypertrophy associated with the reproductive cycle of diploid and triploid scallops, *Argopecten ventricosus*. *J. Shell. Res.* 23 (2), 483-489.
- Palacios, E. I.S. Racotta, E. Kraffe, Y. Marty, J. Moal y J.F. Samain. 2005. Lipid composition of the giant lion's-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) in relation to gametogenesis: I. Fatty acids. *Aquaculture* 250, 14 270-282.
- Patruno, M., S. Sivieri, C. Poltronieri, R. Sacchetto, L. Maccatrozzo, T. Martinello, B. Funkenstein y G. Radaelli. 2008. Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces:Osteichthyes). *J. Cell Tissue Res.* 331, 643-658.
- Pazos A.J., Román G., Acosta C.P., Abad M., Sanchez J.L. 1997. Seasonal changes in condition and biochemical composition of the scallop *Pecten maximus* L. from suspended culture in the Ria de Arousa (Galicia, N.W. Spain) in relation to environmental conditions. *J. Exp. Mar Biol Ecol.* 211, 169-193
- Petersen, J. L. 2009. Conservation and aquacultural genetics of the Pacific lion-paw Scallop (*Nodipecten subnodosus*). Tesis Doctoral. Universidad de California, Davis. b127 pp.
- Petersen, J. L., A. M. Ibarra y B. May. 2010. Nuclear and mtDNA lineage diversity in wild and cultured Pacific lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus* (Baja California Peninsula, Mexico). *Mar. Biol.* 157: 2751-2767.

- Pies, M. R. y L. E. Alvares. 2006. Evolution of myostatin in vertebrates: in there evidence for positive selection?. *Mol. Phylogenet. Evol.* 41: 730-734
- Racotta, I. S., J. L. Ramírez, A. M. Ibarra, M. C. Rodríguez-Jaramillo, D. Carreño y E. Palacios. 2003. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. *Aquaculture* 217: 335-349.
- Racotta, I. S., E. Palacios, A. M. Ibarra, J. L. Ramírez, F. Arcos y O. Arjona. 2008. Comparative biochemical composition of ploidy groups of the lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby) supports the physiological hipótesis for the lack of advantage in triploid mollusc's growth in food-rich environments. *Mar. Biol.* 153: 1245-1256.
- Radaelli, G., A. Rowlerson, F. Mascarello, M. Patrono y B. Funkenstein. 2003. Myostatin precursor is present in several tisúes in teleost fish: a comparative immunolocalization study. *J. Cell Tissue Res.* 311:239-250.
- Radaelli, G. C. Poltronieri, C. Simontacchi, E. Negrato, F. Pascoli, A. Libertini y D. Bertotto. 2010. Immunohistochemical localization of IGF-I, IGF-II and *MSTN* proteins during development of triploid sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Eur. J. Histochem.* 54:e16.
- Ramírez, J. L., S. Avila y A. M. Ibarra. 1999. Optimization of forage in two food-filtering organisms with the use of a continuous, low-food concentration agricultural drill system. *Aquacult. Engineering* 20: 175-189.
- Ramírez, J. L., M. Manzano, Arellano-Martínez, M y A. M. Ibarra. 2009. Culture of triploid lion-paw scallop in a marine protected area as an alternative for low genetic impact aquaculture. In: Book of Abstracts. 17<sup>th</sup> International Pectinid Workshop, Santiago de Compostela, Galicia (Spain).
- Ramírez-Arce. 2009. Evaluación de la ventaja productiva y grado de esterilidad en triploides de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby 1835) como alternativa para el cultivo en el parque nacional Bahía de Loreto, Golfo de California. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. 94 pp.
- Rescan, P-Y., I. Jutel y C. Ralliére. 2001. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Onchorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 204: 3523-3529.
- Roberts, S. B. y F. W. Goetz. 2001. Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. *FEBS Lett.* 491:212-216.
- Rodgers, B. D., G. M. Weber, K. M. y M. A. Levine. 2003. Prolonged fasting and cortisol reduce myostatin mRNA levels in tilapia larvae; short-term fasting elevates. *Am J Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284:R1277-R1286.
- Rodgers, B. D. y D. K. Garikipati. 2008. Clinical, agricultural and evolutionay biology of myostatin: a comparative review. *Endocrine Rev.* 29(5):513-534.

- Rodríguez-Jaramillo, C. M. A. Hurtado, E. Romero-Vivas, J. L. Ramírez, M. Manzano y E. Palacios. 2008. Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during and annual reproductive cycle. *J. Shell. Res.* 27(5): 1129-1141.
- Rodríguez-MoscOSO, E. y R. Arnaiz. 1998. Gametogenesis and energy storage in a population of grooved carpet-shell clam, *Tapes decussurus* (Linne, 1787), in northwest Spain. *Aquaculture* 162:125-139.
- Rozen, S. y H. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 32: Bioinformatics Methods and Protocols. Ed: Misenar, S. y S. A. Krawetz. Humana Press. USA. 365-386.
- Ruiz-Verdugo, C. A., J. L. Ramírez, S. K. Allen Jr. y A. M. Ibarra. 2000. Triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth, gametogenesis, and suppression of functional hermaphroditism. *Aquaculture* 186: 13-32.
- Ruiz-Verdugo, C. A., S. K. Allen Jr. y A. M. Ibarra. 2001a. Family differences in success of triploid induction and effects of triploidy on fecundity of catarina scallop (*Argopecten ventricosus*). *Aquaculture*. 201:19-33.
- Ruiz-Verdugo, C. A., I. S. Racotta y A. M. Ibarra. 2001b. Comparative biochemical composition in gonad and adductor muscle of triploid and diploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 259(2): 155-170.
- Saharinen, J., J. Taipale y J. Keski-Oja. 1996. Association of the small latent transforming growth factor- $\beta$  with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *EMBO J.* 15 (2): 254-253.
- Saina, M. y U. Technau. 2009. Characterization of myostatin/gdf8/11 in the Starlet sea anemone *Nematostella vectensis*. *J. Exp. Zoo.* 312B:780-788.
- Sastry, A.N. y N. J. Blake. 1971. Regulation of gonad development in the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. *Biol. Bull.* 140: 274-282.
- Sato, F., M. Kurokawa, N. Yamauchi y M. Hattori. 2005. Gene silencing of myostatin in differentiation of chicken embryonic myoblasts by small interfering RNA. *Am. J. Phys. Cell Physiol.* 291 (3): 538-545.
- Sheehan D y B. Hrapchak. 1990. *Theory and practice of Histotechnology*. 2nd Ed. Battelle Press. Ohio. 189-190 p.
- Shpigel, M., B. J. Barber y R. Mann. 1992. Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161:15-25.
- Sifuentes-Romero, I., H. Merchant-Larios y A. García-Gasca. 2010. Hox gene expression in the embryonic genital system of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829), a species with temperature-dependent sex determination. *Gene Expression Patterns* 10(6): 290-298.
- Sokal, R. y F. J. Rohlf. 1986. *Introducción a la Bioestadística*. Ed. Reverté. 376 pp.

- Spiller, M. P., R. Kambadur, F. Jeanplong, M. Thomas, J. K. Martyn, J. J. Bass y M. Sharma. 2002. The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Mol. Cell. Biol.* 22(20): 7066-7082.
- Suresh, A.V. y R. J. Sheehan. 1998. Biochemical and morphological correlates of growth in diploid and triploid rainbow trout. *J. Fish Biol.* 52: 588–599.
- Terova, G., G. Bernardini, G. Binelli, R. Gornati y M. Saroglia. 2006. cDNA encoding sequences for myostatin and FGF6 in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) and the effect of fasting and refeeding on their abundance levels. *Domest. Anim. Endocrinol.* 30: 304-319
- Thies, R., T. Chen, M. Davies, K. Tomkinson, A. Pearson, Q. Shakey, y N. Wolfman. 2001. *Growth Factors* 18: 251–259
- Thomas, M., B. Langley, C. Berry, M. Sharma, S. Kirk, J. Bass y R. Kambadur. 2000. Myostatin a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J. Biol. Chem.* 275(51):40235-40243.
- Tichopard, A., R. Kitchen, I. Riedmaier, C. Becker, A. Stahlberg y M. Kubista. 2009. Design and optimization of Reverse-Transcription quantitative PCR Experiments. *J. Clin. Chem.* 55:10
- Vandesompele, J., K. D. Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe y F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3(7): 1-12.
- Vandesompele, J., M. Cubista y M. W. Pfaffl. 2009. Referente gene validation software for improved normalization. En: *Real-time PCR: current technology and applications*. Ed: Logan, J., K. Edwards y N. Saunders. Caister Academic Press. 284 pp.
- Vettor, R., G. Milan, C. Franzin, M. Sanna, P. De Coppi, R. Rizzuto y G. Federspil. 2009. The origin of intermuscular adipose tissue and its pathophysiological implications. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297:E987-E998.
- Vianello, S., L. Brazzoduro, L. Dalla Valle, P. Belvedere y L. Colombo. 2003. Myostatin expresión during development and chronic stress in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Endocrinol.* 176: 47-59.
- Weber, T. E. y B. G. Bosworth. 2005. Effects of 28 day exposure to cold temperature or feed restriction on growth, body composition, and expression of genes related to muscle growth and metabolism in channel catfish. *Aquaculture.* 246: 483-492.
- Wolfman, N., A. C. McPherron, W. N. Pappano, M. V. Davies, K. Song, K. N. Tomkinson, J. F. Wright, L. Zhao, S. M. Sebald, D. S. Greenspan y S. J. Lee. 2003. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (26): 15842-15846.
- Zarnoch, C. B. y M. P. Schreiber. 2008. Influence of temperature and food availability on the biochemical composition and mortality of juvenile *Mercenaria mercenaria* (L.) during the over-winter period. *Aquaculture.* 274 (2-4): 281-291.

- Zatsiorsky, V. M. y W. J. Kraemer. 2006. *Science and practice of strength training*. Ed. Human Kinetics. 251 pp.
- Zhang, L., Z. Bao, J. Cheng, H. Li, X. Huang, S. Wang, C. Zhang y J. Hu. 2007. Fosmid library construction and initial analysis of end sequences in zhikong Scallop (*Chlamys farreri*). *Mar. Biotech.* 9: 606-612.

## 11. ANEXOS

ANEXO		MÉTODO												
I	Paraformaldehído al 4%	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Calentar a 60 °C 450 ml de H<sub>2</sub>O DEPC</li> <li>2.- Disolver 20 g de paraformaldehído en los 450 ml de H<sub>2</sub>O DEPC caliente, cubrir y mantener a 60 °C en agitación (no permitir que suba a más de 70 °C).</li> <li>3.- Adicionar 1 gota de NaOH 2N por cada 100 ml (la solución aclarará en unos minutos).</li> <li>4.- Remover del calor y adicionar 50 ml de PBS 10X.</li> <li>5.- Ajustar el pH a 7.2 adicionando HCl. El volumen final deberá ser de 500 ml.</li> <li>6.- Filtrar y colocar en hielo. Mantenerlo protegido de la luz.</li> <li>7.- Usar inmediatamente o almacenar a -20 °C hasta su uso.</li> </ol>												
II	Tampón fosfato salino 10x (Phosphate buffered saline, PBS 10x)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Disolver en 800 ml de H<sub>2</sub>O DEPC los siguientes reactivos: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 80g de NaCl</li> <li>▪ 2.0g de KCl</li> <li>▪ 14.4g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></li> <li>▪ 2.4g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li> </ul> </li> <li>2.- Ajustar el pH a 7.4.</li> <li>3.- Aforar el volumen a 1 L con H<sub>2</sub>O DEPC</li> <li>4.- Esterilizar por autoclave.</li> </ol>												
III	Extracción de ARN	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Agregar 800 µl de <i>TriPure</i> en un tubo de 1.6 ml.</li> <li>2.- Colocar en el <i>TriPure</i> ~50 mg de tejido previamente lavado en H<sub>2</sub>O DEPC para eliminar el exceso de <i>RNAlater</i> en el que se preservó.</li> <li>3.- Homogenizar la muestra con un macerador mecánico previamente esterilizado</li> <li>4.- Incubar 5 min</li> <li>5.- Centrifugar a 12,000 rpm por 10 min a 4° C</li> <li>6.- Adicionar 160 µl cloroformo a cada muestra y agitar hasta obtener un color rosado (~ 15 s).</li> <li>7.- Incubar las muestras por 15 min a temperatura ambiente</li> <li>8.- Centrifugar a 12,000 rpm por 15 min.</li> <li>9.- Recuperar el sobrenadante y transferir a un tubo de 1.6 ml.</li> <li>10a.- Adicionar 250 µl de isopropanol, invertir el tubo varias veces e incubar a temperatura ambiente por 15 min.</li> <li>10b.- Adicionar 500 µl de etanol absoluto, invertir el tubo varias veces e incubar a -20° C toda la noche.</li> <li>11.- Precipitar el ARN centrifugando a 12,000 rpm por 10 min a 8° C y descartar el sobrenadante.</li> <li>12.- Adicionar 740 µl de etanol al 70% y lavar el pellet pipeteando suavemente.</li> <li>13.- Centrifugar a 7,500 rpm por 5 min a 4° C y descartar el sobrenadante quitando el exceso de etanol con la pipeta y colocando los tubos en hielo.</li> <li>14.- Resuspender el ARN en 50 µl de H<sub>2</sub>O DEPC.</li> <li>15.- Almacenar a -20° C.</li> </ol>												
IV	Síntesis de ADN complementario (cDNA)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Mezclar 5 µl de ARN digerido con DNAsa y 1 µl de oligo (dT) en un tubo limpio de 1.6 ml y colocar en hielo.</li> <li>2.- Incubar a 70° C por 5 min.</li> <li>3.- Poner en hielo por 2 min.</li> <li>4.- Añadir 14 µl de la siguiente reacción a cada tubo: <table style="margin-left: 40px; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>H<sub>2</sub>O DEPC</td> <td style="text-align: right;">3.0 µl</td> </tr> <tr> <td>MgCl<sub>2</sub></td> <td style="text-align: right;">4.5 µl</td> </tr> <tr> <td>dNTP's</td> <td style="text-align: right;">1.0 µl</td> </tr> <tr> <td>RNAsin</td> <td style="text-align: right;">0.5 µl</td> </tr> <tr> <td><u>Enzima RT</u></td> <td style="text-align: right;"><u>1.0 µl</u></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td style="text-align: right;">14 µl</td> </tr> </table> </li> <li>5.- Incubar a 42° C por 1 h.</li> <li>6.- Desactivar la enzima a 70° C por 10 min.</li> <li>7.- Almacenar a -20° C.</li> </ol>	H <sub>2</sub> O DEPC	3.0 µl	MgCl <sub>2</sub>	4.5 µl	dNTP's	1.0 µl	RNAsin	0.5 µl	<u>Enzima RT</u>	<u>1.0 µl</u>	Total	14 µl
H <sub>2</sub> O DEPC	3.0 µl													
MgCl <sub>2</sub>	4.5 µl													
dNTP's	1.0 µl													
RNAsin	0.5 µl													
<u>Enzima RT</u>	<u>1.0 µl</u>													
Total	14 µl													

V	Ligación	<p>a) <u>Ligación con TOPO-TA Cloning.</u>  1.- Preparar la siguiente reacción:</p> <table border="0" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>Salt solution</td> <td style="text-align: right;">1.0 µl</td> </tr> <tr> <td>Vector</td> <td style="text-align: right;">1.0 µl</td> </tr> <tr> <td><u>Producto de PCR</u></td> <td style="text-align: right;"><u>4.0 µl</u></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td style="text-align: right;">6.0 µl</td> </tr> </table> <p>2.- Mezclar suavemente.  3.- Incubar por 5 min a temperatura ambiente.  4.- Poner en hielo los tubos e incubar por 30 min.  5.- Almacenar a -20° C toda la noche.</p> <p>b) <u>Ligación con pGEM-T Easy Vector.</u>  1.- Preparar la siguiente reacción:</p> <table border="0" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>Buffer 2x ligation</td> <td style="text-align: right;">10.0 µl</td> </tr> <tr> <td>pGEM-T Vector</td> <td style="text-align: right;">1.0 µl</td> </tr> <tr> <td>Fragmento purificado</td> <td style="text-align: right;">8.0 µl</td> </tr> <tr> <td><u>DNA ligasa (T4)</u></td> <td style="text-align: right;"><u>1.0 µl</u></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td style="text-align: right;">20.0 µl</td> </tr> </table> <p>2.- Incubar por 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C.  3.- Almacenar a -20° C.</p>	Salt solution	1.0 µl	Vector	1.0 µl	<u>Producto de PCR</u>	<u>4.0 µl</u>	Total	6.0 µl	Buffer 2x ligation	10.0 µl	pGEM-T Vector	1.0 µl	Fragmento purificado	8.0 µl	<u>DNA ligasa (T4)</u>	<u>1.0 µl</u>	Total	20.0 µl
Salt solution	1.0 µl																			
Vector	1.0 µl																			
<u>Producto de PCR</u>	<u>4.0 µl</u>																			
Total	6.0 µl																			
Buffer 2x ligation	10.0 µl																			
pGEM-T Vector	1.0 µl																			
Fragmento purificado	8.0 µl																			
<u>DNA ligasa (T4)</u>	<u>1.0 µl</u>																			
Total	20.0 µl																			
VI	Transformación de ligación con TOPO-TA Cloning Vector (Invitrogen) y levantamiento de colonias	<p>a) <u>Transformación</u>  1.- Preparar 1 día antes cajas Petri con medio LB-Agar con ampicilina y almacenarlas a 4° C (25 g de LB y 15 g de Agar para 1 L; 2.4 µl de ampicilina por 1 ml de LB; 20 ml por caja)  2.- Poner las cajas a 37° C al iniciar la transformación.  3.- Descongelar las bacterias en hielo.  4.- Mezclar 2 µl de ligación en 1 vial de células competentes.  5.- Incubar en hielo por 30 min.  6.- Dar choque térmico a 42° C por 20 s.  7.- Poner en hielo por 2 min.  8.- Adicionar en 250 µl de medio SOC a temperatura ambiente.  9.- Incubar con rotación a 37° C por 2 h, colocando los tubos de manera horizontal.  13.- Inocular 3 cajas Petri con LB-ampicilina de cada transformación:  Caja 1: con 10µl, caja 2: con 30µl y caja 3: con 50µl  14.- Incubar toda la noche a 37° C.</p> <p>b) <u>Levantamiento de colonias</u>  1.- Preparar 1 día antes cajas Petri con medio LB-Agar con ampicilina y almacenarlas a 4° C (25 g de LB y 15 g de Agar para 1 L; 2.4 µl de ampicilina por 1 ml de LB; 20 ml por caja).  2.- Poner las cajas a 37° C, 30 min antes de iniciar el levantamiento de colonias.  3.- Levantar las colonias más aisladas con un palillo de madera, pasar a caja Petri con LB-ampicilina nueva (debidamente numerada) y poner el palillo en tubo con reacción para PCR (uno por colonia).  4.- Marcar las colonias levantadas en caja Petri.  5.- Incubar a 37° C toda la noche.</p>																		
VII	Digestión Enzimática	<p>1.- Preparar la siguiente reacción:</p> <table border="0" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>H<sub>2</sub>O estéril</td> <td style="text-align: right;">7.1 µl</td> </tr> <tr> <td>Buffer H 10x</td> <td style="text-align: right;">1.0 µl</td> </tr> <tr> <td>BSA</td> <td style="text-align: right;">0.1 µl</td> </tr> <tr> <td><u>Eco R I</u></td> <td style="text-align: right;"><u>0.8 µl</u></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td style="text-align: right;">9.0 µl</td> </tr> </table> <p>2.- Distribuir 9 µl de la mezcla en cada tubo  3.- Agregar 1µl de ADN (<i>minipreps</i>).  4.- Incubar a 37° C por 2 h.  5.- Correr gel de agarosa al 1% para observar que colonia tiene el inserto deseado.</p>	H <sub>2</sub> O estéril	7.1 µl	Buffer H 10x	1.0 µl	BSA	0.1 µl	<u>Eco R I</u>	<u>0.8 µl</u>	Total	9.0 µl								
H <sub>2</sub> O estéril	7.1 µl																			
Buffer H 10x	1.0 µl																			
BSA	0.1 µl																			
<u>Eco R I</u>	<u>0.8 µl</u>																			
Total	9.0 µl																			

VIII	Digestión con DNAsa	<p>1.- Poner los tubos con los 50 µl de ARN en hielo.</p> <p>2.- Agregar 15 µl de la siguiente reacción a cada tubo.</p> <table border="0" style="margin-left: 40px;"> <tr> <td>H<sub>2</sub>O estéril</td> <td style="text-align: right;">2.0 µl</td> </tr> <tr> <td>RQ1 Buffer 10x</td> <td style="text-align: right;">6.5 µl</td> </tr> <tr> <td>RNAsin</td> <td style="text-align: right;">0.5 µl</td> </tr> <tr> <td><u>RQ1 DNAsa</u></td> <td style="text-align: right;"><u>6.0 µl</u></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td style="text-align: right;">15 µl</td> </tr> </table> <p>3.- Incubar a 37° C por 30 min.</p> <p>4.- Añadir 6.5 µl de LiCl. 4M a cada tubo.</p> <p>5.- Adicionar 65 µl de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico y agitar con vortex.</p> <p>6.- Centrifugar a máxima velocidad por 10 min a temperatura ambiente.</p> <p>7.- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 1.6 ml (~50 µl).</p> <p>8.- Agregar 2.5 vol de etanol absoluto (125 µl).</p> <p>9.- Precipitar a -20° C toda la noche.</p> <p>10.- Centrifugar a 12,000 rpm a 4° C por 15 min y descartar sobrenadante.</p> <p>11.- Adicionar 500 µl de etanol al 70%.</p> <p>12.- Centrifugar a 12,000 rpm a 4° C por 15 min.</p> <p>13.- Descartar el sobrenadante totalmente con pipeta.</p> <p>14.- Resuspender el pellet en 50µl de H<sub>2</sub>O DEPC.</p>	H <sub>2</sub> O estéril	2.0 µl	RQ1 Buffer 10x	6.5 µl	RNAsin	0.5 µl	<u>RQ1 DNAsa</u>	<u>6.0 µl</u>	Total	15 µl								
H <sub>2</sub> O estéril	2.0 µl																			
RQ1 Buffer 10x	6.5 µl																			
RNAsin	0.5 µl																			
<u>RQ1 DNAsa</u>	<u>6.0 µl</u>																			
Total	15 µl																			
IX	Purificación de producto de PCR/ gel de agarosa con Kit Wizard SV gel and PCR Clean –up System (Promega).	<p>a) <u>Purificación de producto de PCR</u></p> <p>1a.- Juntar el producto de PCR en un tubo (~50 µl).</p> <p>2a.- Añadir 1 volumen de <i>Membrane binding solution</i>.</p> <p>b) <u>Purificación de gel de agarosa al 1%</u></p> <p>1b.- Pesar tubo de 1.6 ml antes de cortar el gel.</p> <p>2b.- Cortar fragmento con navaja estéril.</p> <p>3b.- Añadir 10µl de <i>membrana binding solution</i> por cada 10 mg de gel.</p> <p>4b.- Incubar de 50-65° C por 10 min o hasta que se disuelva el gel por completo; agitar en vortex cada 2-3 min.</p> <p>Continuación de protocolos a) ó b):</p> <p>3.- Colocar una columna en un tubo colector por muestra.</p> <p>4.- Transferir el producto de PCR/gel de agarosa disuelto a la columna e incubar por 1 min.</p> <p>5.- Centrifugar a 12,000 rpm por 1 min.</p> <p>6.- Descartar lavado.</p> <p>7.-Lavar con 700µl de <i>membrane wash solution</i>.</p> <p>8.- Centrifugar a 12,000 rpm por 1 min y descartar lavado.</p> <p>9.- Lavar con 500 µl de <i>membrane wash solution</i>.</p> <p>10.- Centrifugar a 12,000 rpm por 5 min y descartar lavado.</p> <p>11.- Colocar la columna en el tubo colector y centrifugar en seco por 1 min.</p> <p>12.- Transferir la columna a un tubo eppendorf limpio.</p> <p>13.- Añadir 25-50 µl de agua libre de nucleasas.</p> <p>14.- Incubar 1 min a temperatura ambiente.</p> <p>15.- Centrifugar a 12,000 rpm por 1 min.</p> <p>16.- Retirar columna y almacenar a -20° C.</p>																		
X	Digestión de plásmido para sonda de hibridación	<p>1.- Preparar la siguientes reacciones:</p> <table border="0" style="margin-left: 40px;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">Apa I (sentido)</td> <td style="text-align: center;">Pst I (antisentido)</td> </tr> <tr> <td>H<sub>2</sub>O estéril</td> <td style="text-align: right;">35.5µl</td> <td style="text-align: right;">35.5 µl</td> </tr> <tr> <td>Buffer 10x</td> <td style="text-align: right;">5.0 µl</td> <td style="text-align: right;">5.0 µl</td> </tr> <tr> <td>BSA</td> <td style="text-align: right;">0.5 µl</td> <td style="text-align: right;">0.5 µl</td> </tr> <tr> <td><u>Enzima</u></td> <td style="text-align: right;"><u>4.0 µl</u></td> <td style="text-align: right;"><u>4.0 µl</u></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td style="text-align: right;">45.0 µl</td> <td style="text-align: right;">45.0 µl</td> </tr> </table> <p>2.- Agregar 5 µl del plásmido (del total de 50 µl de la digestión enzimática).</p> <p>3.- Incubar a 37° C por 3 h.</p> <p>4.- Correr gel de agarosa al 1% y cortar las bandas de cada digestión para su purificación.</p>		Apa I (sentido)	Pst I (antisentido)	H <sub>2</sub> O estéril	35.5µl	35.5 µl	Buffer 10x	5.0 µl	5.0 µl	BSA	0.5 µl	0.5 µl	<u>Enzima</u>	<u>4.0 µl</u>	<u>4.0 µl</u>	Total	45.0 µl	45.0 µl
	Apa I (sentido)	Pst I (antisentido)																		
H <sub>2</sub> O estéril	35.5µl	35.5 µl																		
Buffer 10x	5.0 µl	5.0 µl																		
BSA	0.5 µl	0.5 µl																		
<u>Enzima</u>	<u>4.0 µl</u>	<u>4.0 µl</u>																		
Total	45.0 µl	45.0 µl																		

XI	Transformación de ligación con pGEM-T Easy Vector y levantamiento de colonias	<p><u>a) Transformación</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Preparar 1 día antes cajas Petri con medio LB-Agar con ampicilina y almacenarlas a 4° C (25 g de LB y 15 g de Agar para 1 L; 2.4 µl de ampicilina por 1 ml de LB; 20 ml por caja).</li> <li>2.- Poner las cajas a 37° C al iniciar la transformación.</li> <li>3.- Descongelar las bacterias en hielo.</li> <li>4.- Mezclar 5µl de ligación en 50 µl de bacterias.</li> <li>5.- Incubar en hielo por 30 min.</li> <li>6.- Dar choque térmico a 37° C por 20 s.</li> <li>7.- Poner en hielo por 2 min.</li> <li>8.- Incubar en 1.5 ml de medio SOC.</li> <li>9.- Transferir a un tubo para centrifuga.</li> <li>10.- Incubar a 37° C con agitación por 1 h.</li> <li>11.- Centrifugar a 8,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente.</li> <li>12.- Descartar sobrenadante y resuspender el pellet en el residual (~50 µl).</li> <li>13.- Inocular dos cajas Petri con LB-ampicilina, las cuales previamente se agregaron 40µl de X-Gal (16µl de X-Gal + 24 µl de dimetilformamida) y 7µl de IPTG Caja 1: con 10µl y caja 2: con el sobrante (hasta 50 µl).</li> <li>14.- Incubar toda la noche a 37° C.</li> </ol> <p><u>b) Levantamiento de colonias</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Preparar LB con ampicilina fresco (2.4µl de ampicilina por 1 ml de LB).</li> <li>2.- Distribuir en tubos <i>Falcon</i> 2 ml de LB-ampicilina por cada tubo.</li> <li>3.- Levantar las colonias más aisladas con un palillo de madera y colocarlo en un tubo <i>Falcon</i> (uno por colonia).</li> <li>4.- Marcar las colonias levantadas en caja Petri.</li> <li>4.- Incubar a 37° C con agitación a 240 rpm toda la noche.</li> </ol>																					
XII	Minipreps	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Transferir 1.5 ml de cultivo bacteriano a un tubo eppendorf.</li> <li>2.- Centrifugar 1 min a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante totalmente.</li> <li>3.- Agregar 100 µl de <i>Cell resuspension solution</i> (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM de EDTA pH 8.0; 80 µg de <i>RNAse</i>) y resuspender el pellet.</li> <li>4.- Agregar 100µl de buffer de lisis 200 mM NaOH y SDS 1% (preparar en el momento a partir de soluciones 400 mM NaOH y SDS 2%; medio volumen de cada una).</li> <li>5.- Agregar 120 µl de buffer de neutralización (Acetato de potasio 3M pH 5.5; ajustar pH con ácido acético) y mezclar por 3 min.</li> <li>6.- Centrifugar por 1 min a máxima velocidad y transferir sobrenadante a un tubo nuevo.</li> <li>7.- Agregar 200 µl de isopropanol y mezclar.</li> <li>8.- Centrifugar por 1 min a máxima velocidad y descartar sobrenadante.</li> <li>9.- Agregar 500 µl de etanol al 70% mezclar.</li> <li>10.- Centrifugar por 1 min a máxima velocidad y descartar sobrenadante, volver a centrifugar y eliminar sobrenadante con punta.</li> <li>11.- Agregar 25 µl de H<sub>2</sub>O estéril y resuspender el pellet.</li> <li>12.- Realizar digestión enzimática.</li> </ol>																					
XIII	Marcaje de sonda de hibridación	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Mezclar 10 µl de plásmido linearizado con 3 µl de H<sub>2</sub>O DEPC para cada sonda y poner en hielo.</li> <li>2.- Preparar las siguientes reacciones: <table border="0" data-bbox="617 1491 1104 1711"> <thead> <tr> <th></th> <th>SP6 (Apa I) (sentido)</th> <th>T7 (Pst I) (antisentido)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10x NTP lab mix (7)</td> <td>2.0 µl</td> <td>2.0 µl</td> </tr> <tr> <td>10x transcription buffer</td> <td>2.0 µl</td> <td>2.0 µl</td> </tr> <tr> <td>RNAse inhibitor (10)</td> <td>1.0 µl</td> <td>1.0 µl</td> </tr> <tr> <td>RNApol SP6 (11)</td> <td>2.0 µl</td> <td>---</td> </tr> <tr> <td>RNApol T7 (12)</td> <td>---</td> <td>2.0 µl</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>7.0 µl</td> <td>7.0 µl</td> </tr> </tbody> </table> </li> <li>3.- Mezclar y centrifugar brevemente.</li> <li>4.- Incubar por 2 h a temperatura ambiente.</li> <li>5.- Agregar 2 µl de DNAsa I (vial 9 del kit) e incubar 15 min a temperatura ambiente.</li> <li>6.- Agregar 2 µl de EDTA 0.2M, pH 8.0 para detener la reacción.</li> <li>7.- Almacenar a -20° C.</li> </ol>		SP6 (Apa I) (sentido)	T7 (Pst I) (antisentido)	10x NTP lab mix (7)	2.0 µl	2.0 µl	10x transcription buffer	2.0 µl	2.0 µl	RNAse inhibitor (10)	1.0 µl	1.0 µl	RNApol SP6 (11)	2.0 µl	---	RNApol T7 (12)	---	2.0 µl	Total	7.0 µl	7.0 µl
	SP6 (Apa I) (sentido)	T7 (Pst I) (antisentido)																					
10x NTP lab mix (7)	2.0 µl	2.0 µl																					
10x transcription buffer	2.0 µl	2.0 µl																					
RNAse inhibitor (10)	1.0 µl	1.0 µl																					
RNApol SP6 (11)	2.0 µl	---																					
RNApol T7 (12)	---	2.0 µl																					
Total	7.0 µl	7.0 µl																					

XIV	Preparación de laminillas con Poly-L-lisina (Sigma)	<p>1.- Enjuagar las laminillas con H<sub>2</sub>O Milli-Q.  2.- Sumergir por completo las laminillas en la solución de lavado por 30 min (sacar y sumergir varias veces).</p> <p style="padding-left: 40px;">Solución de lavado para 30 laminillas  NaOH            33 g  H<sub>2</sub>O Milli-Q    133 ml  Etanol 95%    200 ml</p> <p>3.- Enjuagar las laminillas con H<sub>2</sub>O Milli-Q varias veces.  4.- Sumergir por completo las laminillas en la solución de Poly-L-lisina por 30 min (secando previamente el H<sub>2</sub>O de las laminillas).</p> <p style="padding-left: 40px;">Solución de poly-L-lisina para 30 laminillas  H<sub>2</sub>O Milli-Q    250 ml  PBS 1X (filtrado) 35 ml  Poly-L-lisina    60 ml</p> <p>Nota: La Poly-L-lisina se agrega hasta el momento que se va a utilizar la solución.</p> <p>5.- Enjuagar las laminillas con H<sub>2</sub>O Milli-Q una vez para quitar el excedente.  6.- Enjuagar las laminillas con Etanol al 100% una vez.  7.- Poner a secar en un horno o estufa a 50 °C toda la noche y almacenar no mas de 14 días antes de su uso.</p> <p>*La solución de Poly-L-lisina puede ser almacenada en plástico y reutilizada hasta 6 veces agregando 2-3 ml de nueva Poly-L-lisina por cada uso.</p>
XV	Soluciones stock para la hibridación in situ	<p><u>Buffer de ácido maleico-NaCl</u> (500 ml)  1.- Disolver 0.1 M de ácido maleico en 200 ml de H<sub>2</sub>O destilada y ajustar pH a 7.5.  2.- Disolver en ácido maleico 0.15 M de NaCl y ajustar pH a 7.5.  3.- Aforar a 500 ml y esterilizar.</p> <p><u>Blocking solution 10x</u> (10 ml)  1.- Disolver 1 g de <i>Blocking Reagent</i> en 10 ml de ácido maleico-NaCl  2.- Esterilizar y congelar en alícuotas de 1 ml.</p> <p><u>Proteinasa K</u> (20mg/ml)  1.- Agregar 5 ml de H<sub>2</sub>O DEPC a 100 mg de <i>Proteinasa K</i> y congelar en alícuotas de 1 ml.</p> <p><u>Buffer SSC 20x</u> (500 ml).  1.- Disolver 1.5 M de NaCl y 0.26 M de Citrato de Sodio (C<sub>6</sub> H<sub>5</sub> Na<sub>3</sub>) en H<sub>2</sub>O ultrapura.  2.- Ajustar pH a 7.0.  3.- Aforar a 500 ml y esterilizar.</p> <p><u>Buffer de detección</u>  1.- Disolver 0.1 M de Tris-HCl y 0.1 M de NaCl en 250 ml de H<sub>2</sub>O ultrapura.  2.- Ajustar pH a 9.5 y esterilizar.</p>
XVI	Soluciones de trabajo para la hibridación in situ	<p><u>Paraformaldehído 4%</u>  1.- Disolver 1.6 g de Paraformaldehído en 40 ml de PBS 1x DEPC.  2.- Calentar a 65° C con agitación hasta disolverse por completo.</p> <p><u>Proteinasa K</u> (10 µg/ml).  1.- Disolver 0.5 µl de <i>Proteinasa K</i> (20 mg/ml ) en 999.5 µl de PBS 1x DEPC.</p> <p><u>Buffer de lavado 1 (SSC 2x/0.1% SDS)</u>  1.- Mezclar 25 ml de SSC 20x con 2.5 ml de SDS 10%.  2.- Aforar a 250 ml con H<sub>2</sub>O ultrapura estéril.</p> <p><u>Buffer de lavado 2 (SSC 0.5/0.1% SDS)</u>  1.- Mezclar 6.5 ml de SSC 20x con 2.5 ml de SDS 10%.  2.- Aforar a 250 ml con H<sub>2</sub>O ultrapura estéril.</p> <p><u>Buffer de lavado 3 (Buffer de ácido maleico/ 0.3% Tween 20)</u>  1.- Mezclar 470.56 ml de buffer de ácido maleico con 1.44 ml de <i>Tween 20</i>  2.- Aforar a 480 ml con H<sub>2</sub>O ultrapura estéril.</p> <p><u>Blocking solution 1x</u>  1.- Diluir 1:10 en buffer de ácido maleico.</p>

<b>XVII</b>	<b>Hibridación <i>in situ</i></b>	<p>1.- Desparafinar e hidratar las laminillas</p> <p style="padding-left: 20px;">xilol 1 - 10 min xilol 2 - 10 min etanol 100% - 5 min (1) etanol 95% - 5 min etanol 80% - 5 min etanol 50% - 5 min H<sub>2</sub>O DEPC - 5 min PBS DEPC - 5 min</p> <p>2.- Drenar el líquido y colocar en cámara húmeda (humedecer con SSC 2x).</p> <p>3.- Agregar 100 µl de <i>proteínasa K</i> (10 µg/ml) en PBS a cada laminilla y cubrir con parafilm.</p> <p>4.- Incubar 15 min a 37° C.</p> <p>5.- Lavar en PBS 1x durante 5 min a temperatura ambiente.</p> <p>6.- Colocar las laminillas en Paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente.</p> <p>7.- Lavar en PBS 1x nuevo por 5 min, dos veces.</p> <p>8.- Lavar en H<sub>2</sub>O DEPC y deshidratar las laminillas.</p> <p style="padding-left: 20px;">H<sub>2</sub>O DEPC - 5 min etanol 50% - 5 min etanol 80% - 5 min etanol 95% - 5 min etanol 100% - 5 min (2)</p> <p>9.- Dejar secar al aire libre durante 20 min.</p>
<b>XVIII</b>	<b>Hibridación</b>	<p>10.- Agregar ~65 µl de solución de hibridación en un tubo estéril por cada laminilla a hibridar (1 tubo para sonda sentido y 1 tubo para sonda antisentido).</p> <p>11.- Adicionar 5 µl de cada sonda en cada tubo (T7=antisentido y SP6=sentido) y mezclar pipeteando varias veces.</p> <p>12.- Agregar 70 µl de sonda a cada laminilla debidamente marcada y cubrir con parafilm.</p> <p>13.- Incubar toda la noche a 42° C en cámara humedecida con SSC 2x.</p>

XIX	Lavados post-hibridación y detección	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Lavar 2 veces con buffer de lavado 1 (SSC 2x/0.1 SDS) por 5 min a temperatura ambiente.</li> <li>2.- Lavar 2 veces con buffer de lavado 2 (SSC 0.5x/0.1 SDS) a 42° C por 5 min.</li> <li>3.- Lavar con buffer de lavado 3 (Buffer de ácido maleico/Tween 20 0.3%) a temperatura ambiente por 5 min.</li> <li>4.- Drenar el líquido de las laminillas y colocarlas en cámara humedecida con SSC 2x.</li> <li>5.- Añadir 100 µl de <i>Blocking solution</i> 1x y cubrir con parafilm.</li> <li>6.- Incubar 30 min a temperatura ambiente.</li> <li>7.- Drenar el líquido y añadir 100 µl de solución anti-dig 1:100 (1µl de anti-dig diluido en 99 µl de <i>blocking solution</i> 1x) y cubrir con parafilm.</li> <li>8.- Incubar 30 min a temperatura ambiente.</li> <li>9.- Lavar 2 veces en buffer de lavado 3 por 5 min.</li> <li>10.- Drenar el líquido de las laminillas y colocarlas en cámara húmeda</li> <li>11.- Equilibrar con 100 µl de buffer de detección (Tris-HCl, pH 9.5) e incubar por 10 min a temperatura ambiente.</li> <li>12.- Preparar la solución de revelado: 3µl NBT/BCIP en 150 µl de buffer de detección y mezclar.</li> <li>13.- Drenar las laminillas y colocarlas en cámara húmeda</li> <li>14.- Agregar 150 µl de la solución de revelado a cada laminilla.</li> <li>15.- Incubar por 15 min en oscuridad.</li> <li>16.- Enjuagar las laminillas con H<sub>2</sub>O ultrapura estéril 2 veces.</li> <li>17.- Teñir las laminillas por 30 s con Eosina-Fucsina</li> <li>18.- Sumergir 10 veces las laminillas en etanol al 96% (4 diferentes soluciones)</li> <li>19.- Sumergir 10 veces las laminillas en etanol al 100% (4 diferentes soluciones).</li> <li>20.- Sumergir 10 veces las laminillas en xilol (3 diferentes soluciones).</li> <li>21.- Montar.</li> </ol>
XX	Extracción de ARN con el kit SV Total RNA Isolation System (Promega).	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Eliminar el <i>RNA later</i> de la muestra</li> <li>2.- Añadir 500 µl de <i>SV RNA lysis buffer</i> y homogenizar.</li> <li>3.- Transferir 200 µl de lisado a un tubo de microcentrífuga (el lisado adicional debe ser almacenado a -20°C).</li> <li>4.- Añadir 350 µl de <i>SV RNA dilution buffer</i>. Mezclar por inversión 3 o 4 veces e incubar a -70°C por 3 min.</li> <li>5.- Centrifugar 10 min a máxima velocidad.</li> <li>6.- Transferir el sobrenadante a un tubo para microcentrífuga limpio, sin tocar el pellet.</li> <li>7.- Añadir 200 µl de etanol al 95% y mezclar por inversión 3 o 4 veces.</li> <li>8.- Transferir la mezcla a la columna y centrifugar a máxima velocidad por 1 min.</li> <li>9.- Descartar el líquido del tubo colector, añadir 600 µl de <i>SV RNA wash solution</i> a la columna y centrifugar a máxima velocidad por 1 min.</li> <li>10.- Vaciar el tubo colector y añadir 250 µl de <i>SV RNA wash solution</i> a la columna y centrifugar a máxima velocidad por 2 min.</li> <li>11.- Remover la tapa de la columna.</li> <li>12.- Poner la columna en un tubo 1.6 ml y añadir 30 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, cubriendo toda la membrana de la columna, centrifugar a temperatura ambiente por 1 min a máxima velocidad.</li> <li>14.- Añadir 20 µl de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC, cubriendo toda la membrana de la columna, centrifugar a temperatura ambiente por 1 min a máxima velocidad.</li> <li>15.- Descartar la columna, tapar el tubo con el ARN y almacenar a -70°C.</li> </ol>