



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE LA *MIOSTATINA* COMO
UN REGULADOR NEGATIVO DEL CRECIMIENTO
MUSCULAR EN LA ALMEJA MANO DE LEÓN *Nodipecten*
subnodosus Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EL
MÚSCULO ADUCTOR EN RESPUESTA A ESTRÉS
NUTRICIONAL

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

Presenta

Rosa María Morelos Castro

La Paz, Baja California Sur, Julio de 2015.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13 horas del día 29 del Mes de Junio del 2015, 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:

"Caracterización del gen de la *miostatina* como un regulador negativo del crecimiento muscular en la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* y análisis de la expresión génica en el músculo aductor en respuesta a estrés nutricional"

Presentada por el alumno:

Rosa María Morelos Castro

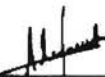
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Orientación Acuicultura

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

LA COMISION REVISORA



Dra. Ana María Ibarra Humphries
Co-Director de Tesis



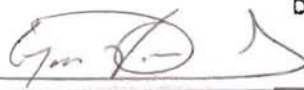
Dra. Alejandra García Gasca
Co-Director de Tesis



Dr. Jorge Ramírez Salcedo
CO-TUTOR



Dra. Gracia Gómez Anduro
CO-TUTOR



Dra. Fabiola Arcos Ortega
CO-TUTOR

DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,

DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Ana María Ibarra Humphries (Co-Directora de tesis, CIBNOR)

Dra. Alejandra García Gasca (Co-Directora de tesis, CIAD)

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro (Cotutor, CIBNOR)

Dra. Fabiola Arcos Ortega (Cotutor, CIBNOR)

Dr. Jorge Ramírez Salcedo (Cotutor, UNAM)

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dra. Ana María Ibarra Humphries

Dra. Alejandra García Gasca

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Dra. Fabiola Arcos Ortega

Dr. Jorge Ramírez Salcedo

JURADO DE EXÁMEN

Dra. Ana María Ibarra Humphries

Dra. Alejandra García Gasca

Dra. Fabiola Arcos Ortega

Dr. Cesar Ruíz Verdugo (Suplente)

Dra. Cristina Escobedo Fregoso (Suplente)

Resumen

La almeja mano de león, *Nodipecten subnodosus*, es el pectínido más grande de las costas del Pacífico en el continente Americano, con un músculo aductor de alto valor comercial. La miostatina es una proteína de la superfamilia de TGF- β cuya función en vertebrados es el control del crecimiento muscular. En este trabajo se aisló la secuencia completa del transcrito de la *miostatina* de *Nodipecten subnodosus* con fines de estudiar su participación en el crecimiento de esta especie. Se aisló un transcrito con un ORF de 1380 pb que codifica para una proteína de 459 aa con alta identidad a la previamente aislada en otros pectínidos, pero encontrando dos sitios de procesamiento proteolítico, el previamente reportado (RSKR) y un segundo en una posición 266-269 aa (RRKR), lo que es importante ya que la presencia de más de un sitio de procesamiento proteolítico en otras proteínas de la superfamilia de las TGF- β ha sido asociada con la posible generación de variantes y con mecanismos de señalización tisular de corto y largo alcance. Otro resultado no antes visto en pectínidos es que se identificaron dos UTR-5's, los cuales presentan tamaños diferentes (234 y 57 pb); el análisis *in silico* mostró que la UTR-5' más larga presenta una secuencia consenso tata-box (TATAAA) que explica el transcrito más corto ya que se localiza 27 pb antes del inicio del transcrito corto. La UTR-3' contiene varios elementos *cis*-reguladores de la traducción, pero en particular se encontraron varias K-boxes, con una de ellas presente en todas las secuencias de *mstn* de pectínidos, infiriéndose que puede representar un sitio de reconocimiento de miRNAs. Finalmente, durante la caracterización del transcrito de la *mstn* se encontró un transcrito variante en diversos tejidos, el cual se infiere que es resultado de un splicing alternativo, el cual de ser traducido, daría lugar a una proteína trunca justo antes del sitio proteolítico que da lugar a la MSTN madura. A partir de la secuencia obtenida se realizaron varios estudios y experimentos en los que se evaluó por qPCR la expresión de la miostatina; debido a la presencia del splicing alterno, se evaluó la expresión de transcritos utilizando cebadores que amplifican solo transcritos sin el splicing (deleción) alterno así como ambos posibles transcritos (con y sin splicing). (I) En un primer estudio se evaluó por qPCR la expresión temporal de la *miostatina* en el músculo aductor durante un periodo de crecimiento en un sitio de baja disponibilidad de alimento como Bahía de Loreto, mostrando que la expresión presentó diferencias significativas entre meses ($P < 0.05$), incrementando durante los meses de verano cuando tanto la biomasa como el peso del músculo aductor mostraron un decremento en su peso; esto se observó en paralelo a decrementos en la disponibilidad de alimento e incrementos de la temperatura del agua. El análisis puntual (Agosto) de expresión tisular indicó que la mayor expresión de la *miostatina* fue en el músculo aductor, seguido del manto y las branquias con diferencias significativas ($P < 0.05$) con la gónada y la glándula digestiva. (II) En un segundo estudio se evaluó la expresión temporal de este gen en diferentes tejidos de la almeja (branquia, manto, gónada, glándula digestiva y músculo aductor) durante un ciclo de crecimiento en un sitio de alta productividad como es Rancho Bueno, encontrando que mientras que el músculo aductor presentó nuevamente su mayor expresión en Agosto posiblemente asociado con el posdesove como en el estudio de Bahía de Loreto, la expresión en otros tejidos como manto y branquia fue tan o más alta como la del músculo aductor en Abril y Octubre, permitiéndonos sugerir que este gen posiblemente tiene un rol adicional al de

crecimiento muscular en *Nodipecten subnodosus*. Aunado a estos resultados, el análisis filogenético donde se agrupa a la MSTN de moluscos, la MYO de *Drosophila* spp. y la MSTN/GDF-11 de crustáceos, presenta evidencia suficiente para sugerir que en *N. subnodosus* la MSTN es ortóloga de la MSTN/GDF-11, descrita como una sola proteína en otras especies de invertebrados por la homología de la presunta MSTN con ambas proteínas en vertebrados y porque mientras que en vertebrados se encuentran dos genes, *miostatina* y *gdf-11* con funciones diferentes, presuntamente derivados de una duplicación ancestral, en invertebrados solamente existe un gen. Dado que este gen se encontró expresado en otros tejidos como manto, se propone una función del mismo en el control del crecimiento de la concha, similarmente al papel que GDF-11 tiene en la biomineralización del hueso en vertebrados. Su función en branquia se desconoce. (III) En tercera instancia y con fines de complementar los resultados obtenidos con los estudios previos, se realizaron dos experimentos controlados de alimentación (alta y baja). El análisis de expresión de la *miostatina*, no presentó diferencias significativas entre el grupo de alto alimento y el grupo sometido a baja alimentación ($P > 0.05$) para ninguno de los experimentos realizados durante el presente trabajo. Sin embargo, en el experimento de estrés nutricional con organismos de dos años de edad provenientes de Laguna Ojo de Liebre, la mayor expresión en ambos grupos experimentales fue en el músculo aductor, mientras que en el experimento donde se utilizaron organismos de aproximadamente un año de edad provenientes del Estero de Rancho Bueno la mayor expresión fue en el manto, corroborando los resultados de los estudios anteriores donde se encontró que la *mstn* se expresa en otros tejidos durante el crecimiento. La cuantificación por qPCR de las posibles variantes de la miostatina en *N. subnodosus* realizada en los diferentes análisis que se llevaron a cabo en el presente estudio, no mostró un patrón definido de expresión. Sin embargo, dada la expresión diferencial encontrada entre tejidos de esta especie podemos inferir que la expresión de las posibles variantes de la *miostatina* en esta especie son tejido específica y se van a expresar preferentemente bajo condiciones de estrés nutricional. (IV) Finalmente, la hibridación de un microarreglo heterólogo con ADNc de músculo aductor permitió observar el estado metabólico de los organismos de Ojo de Liebre que fueron sometidos a estrés nutricional, encontrando que los genes sobre- y sub-regulados de las rutas metabólicas como carbohidratos y lípidos fueron los más afectados, permitiendo inferir que estos organismos están haciendo uso de los triglicéridos como fuente de energía, posiblemente debido a que ya habían utilizado sus reservas de glucógeno durante la gametogénesis y desove que ocurrió en campo previo a realizar el experimento.



Dra. Ana Maria Ibarra Humphries
Vo. Bo.



Dra. S. Alejandra García Gasca
Vo. Bo.

Abstract

The Pacific lion-paw, *Nodipecten subnodosus*, is the largest pectinid species in the Pacific coast of the American continent, and its adductor muscle is highly priced. Myostatin is a member of the TGF- β protein superfamily which controls muscle growth. In this work, the full sequence of the myostatin transcript from *N. subnodosus* was isolated to study its role in muscle growth regulation in this species. The transcript contains a 1380 bp ORF encoding for a 459 aa protein, showing high identity to previously isolated transcripts from other pectinids, but, in this case, finding two proteolytic-processing sites, the previously reported (RSKR), and a second one at 266-269 aa (RRKR), which is important since more than one proteolytic-processing site in other members from the TGF- β superfamily have been associated with transcription of variants and tissue signaling mechanisms at short and long range. Another result reported for the first time in pectinids is the identification of two 5' UTRs of different size (234 and 57 bp); *in silico* analysis showed that the longer 5' UTR contains a consensus tata-box sequence (TATAAA) 27 bp upstream the first base of the shorter transcript. The 3' UTR contains several *cis*-acting elements for translation, particularly several K-boxes, one of them is present in all myostatin sequences from pectinids, suggesting that it represents a miRNA recognition site. Finally, during the characterization of the *mstn* transcript, a variant was found in several tissues, probably derived from alternative splicing which, in case it is translated, would produce a truncated protein just before the proteolytic site which is important to produce the mature protein. The expression of myostatin was analyzed in several experiments by qPCR; due to the presence of potential alternative-spliced variants, these were evaluated using different sets of primers; one set amplifies only the unspliced variant, while the other amplifies both variants. (I) In the first study, the temporal expression of myostatin in adductor muscle was measured by qPCR during a grow-out period in Bahia de Loreto, which is a site of low food availability, showing significant differences between months ($P < 0.05$), increasing during the summer months when both biomass and adductor muscle weight decreased; in parallel food availability also decreased and water temperature increased. Tissue expression analysis in one month (August) indicated that the tissue with the highest expression of myostatin was the adductor muscle, followed by the mantle and gills with significant differences ($P < 0.05$) with gonad and digestive gland. (II) In a second study, the temporal expression of myostatin was evaluated in different tissues (gills, mantle, gonad, digestive gland, and adductor muscle) during a grow-out period in Rancho Bueno, a site of high food availability. Again the highest expression was detected in the adductor muscle in August, probably associated to the post-spawning stage as in Bahia de Loreto; expression in other tissues such as mantle and gills was as high as or even higher than adductor muscle in April and October, suggesting additional roles for myostatin, other than the regulation of muscle growth in *N. subnodosus*. Together with these results, the phylogenetic analysis grouping MSTN from mollusks, MYO from *Drosophila* spp, and MSTN/GDF-11 from crustaceans shows that *N. subnodosus* MSTN is an orthologue of MSTN/GDF-11, described as a single protein for other invertebrate species, this is because of the homology observed between putative MSTN and both vertebrate proteins; both genes (*myostatin* and GDF-11) in vertebrates perform different functions but are thought to derive from an ancestral duplication of the genome, therefore in vertebrates

there is only one *mstn* gene. Since this gene was expressed in non-muscle tissues such as mantle, it may participate in shell formation, performing a GDF-11-like role in bone biomineralization in vertebrates. Its function in the gill is still unknown. (III) In order to complement the field results, two feeding experiments (high and low food ingest) were performed under controlled conditions. Myostatin expression analysis did not show significant differences between both food conditions ($P>0.05$) for any of the experiments. Nevertheless, the nutritional stress experiment in two year-old organisms from Laguna Ojo de Liebre showed higher expression in the adductor muscle in both experimental groups, while in one-year old organisms from Rancho Bueno the highest expression was detected in mantle, confirming previous results in which *mstn* is expressed in other tissues during the growth period. Quantification by qPCR of potential myostatin variants in *N. subnodosus* performed during this study did not show a specific expression pattern. However, given the differential expression observed in different tissues it is possible that the expression of splice variants is tissue-specific, mainly under nutritional stress conditions. (IV) Finally, the heterologous microarray hybridized with cDNA from adductor muscle showed the metabolic status of organisms from Ojo de Liebre under nutritional stress, finding up- and down-regulated genes involved in metabolic routes such as carbohydrates and lipids which were the most affected, suggesting that these organisms are using triglycerides as energy source, probably because they had used all glycogen reserves during gametogenesis and spawning which occurred in the field just before the experiment.



Dra. Ana Maria Ibarra Humphries
Vo. Bo.



Dra. S. Alejandra García Gasca
Vo. Bo.

Dedicatoria

*A mí madre y hermano que se adelantaron en el camino
Ana María.... muchas gracias por todos estos años de aprendizaje*

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado (224237) y al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por las facilidades prestadas para el desarrollo de este trabajo.

Al proyecto CONACYT-CB-2011-166573, “Genómica del molusco pectínido *Nodipecten subnodosus* en condición diploide y triploide: mecanismos genéticos de diferenciación sexual, del control de la fidelidad de la meiosis y del crecimiento muscular”, a cargo de la Dra. Ana María Ibarra Humphries.

Al personal de posgrado Dra. Elisa Serviere, Lic. Osvelia Ibarra, Lic. Leticia González Rubio, Claudia Olachea y Tania V. Núñez por todo el apoyo recibido. A Horacio Sandoval por su siempre disponible apoyo.

A la Dra. Ana María Ibarra por el apoyo y guía recibidos durante mis estudios de doctorado, pero además durante todos los años que me ha permitido trabajar con su ella y su grupo de trabajo. Muchas gracias por tu apoyo académico y personal, no sólo has hecho que sea mejor académicamente, también soy mejor persona

A la Dra. Alejandra García Gasca por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo, sus aportaciones y comentarios, muchas gracias.

Al comité tutorial Dr. Jorge Ramírez Salcedo, Dra. Gracia Gómez Anduro y Dra. Fabiola Arcos Ortega por sus comentarios que permitieron mejorar el trabajo desarrollado durante el doctorado y la escritura de tesis.

A los técnicos de laboratorio M. en C. Susana Ávila Álvarez y M. en C. José Luis Ramírez Arce por su apoyo recibido para el desarrollo de este trabajo.

Al equipo de trabajo del laboratorio húmedo por su apoyo en el desarrollo de los experimentos: Jose Luis, Tavo, Will y Gabriel.

A los compañeros del laboratorio Susana, Pedro, Itzia, Armando, Adriana, Claudia, Pavel, Mayra, Jose Luis, Tavo, Gabriel y Will.

A mi familia que aún con los quebrantos a los que nos hemos enfrentado seguimos juntos, muchas gracias por quererme tanto aún cuando estoy tan lejos de ustedes. Muchas gracias Ana por preocuparte por mí cuando más lo necesitaba.

A la familia Toyas-Fragoso que siempre ha estado al pendiente de mí, mi familia hoy y siempre. Muchas gracias Karlita por tu apoyo en los momentos más difíciles, por preocuparte. A los que aunque están lejos nunca han dejado de apoyarme y creer en mí, gracias Jehú. Muchas gracias Mayra por tu apoyo y amistad, siempre tendrás la mía.

A los que echan porras desde lejos y desde cerca, ustedes saben quiénes son.

CONTENIDO

Comité tutorial.....	i
Resumen.....	ii
Abstract.....	iv
Dedicatoria.....	vi
Agradecimientos.....	vii
CONTENIDO.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABLAS.....	xvii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 La familia de la <i>miostatina</i>	6
2.2 Ortólogos de la <i>miostatina</i> en invertebrados.....	9
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVO GENERAL.....	17
5.1. Objetivos Específicos.....	17
6. MATERIALES Y METODOS.....	18
6.1 RT-PCR (PCR de punto final) en músculo aductor, glándula digestiva y gónada para la evaluación de posibles productos de splicing alternativo.....	19
6.1.1 Amplificación por PCR de punto final del ADN complementario (ADNc) de músculo aductor, glándula digestiva y gónada de <i>Nodipecten subnodosus</i>	19
6.1.2 Clonación de los fragmentos amplificados.....	20
6.2 Caracterización completa del transcrito de la <i>miostatina</i> por RACE (Random Amplification of cDNA Ends) individualmente en músculo aductor, glándula digestiva y gónada.....	23
6.2.1 Extracción de ARN y purificación de poly (A+).....	23
6.2.2 Síntesis de ADNc (ADN complementario) por RACE.....	25
6.2.3 Amplificación por PCR punto final.....	25
6.2.4 Clonación y secuenciación.....	28
6.2.5 Análisis in silico de las secuencias obtenidas por RACE.....	29

6.2.6	Diseño de cebadores específicos para la amplificación de la <i>miostatina</i> en <i>Nodipecten subnodosus</i> para el análisis de expresión en el presente estudio.....	30
6.2.7	Extracción de ADN genómico y amplificación del Intrón II del gen de la <i>miostatina</i> en <i>Nodipecten subnodosus</i>	31
6.2.8	Identificación de posibles sitios alternativos de splicing.....	32
6.3	Modelación <i>in silico</i> de la proteína de la <i>miostatina</i> de <i>Nodipecten subnodosus</i>...	32
6.4	Análisis filogenéticos y alineamiento con proteínas homólogas/ortólogas de la <i>miostatina</i> de <i>Nodipecten subnodosus</i> y miembros de la superfamilia de TGF-β.....	33
6.4.1	Análisis filogenético de la <i>miostatina</i> de <i>N. subnodosus</i> y miembros de la superfamilia de TGF- β	33
6.4.2	Alineamiento de proteínas homologas/ortólogas de la <i>miostatina</i> de <i>Nodipecten subnodosus</i>	34
6.5	Cuantificación por PCR en tiempo real (qPCR) de la expresión del transcrito de la <i>miostatina</i> en músculo aductor de <i>Nodipecten subnodosus</i> durante un ciclo anual de crecimiento en un sitio de baja productividad y determinación de su ubicuidad....	34
6.5.1	Obtención de material biológico.....	35
6.5.2	Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc).....	36
6.5.3	Evaluación de la estabilidad de los genes de referencia para la normalización de la expresión del gen de la <i>miostatina</i>	37
6.5.4	Análisis de la expresión relativa de la <i>miostatina</i> en músculo aductor de <i>Nodipecten subnodosus</i> en un ciclo de crecimiento en un sitio de baja productividad.....	39
6.5.5	Análisis estadísticos.....	40
6.6	Búsqueda de rutas metabólicas afectadas por condiciones experimentales de estrés nutricional, en el músculo aductor de organismos de <i>Nodipecten subnodosus</i> por medio de un microarreglo heterólogo y análisis de la expresión de la <i>miostatina</i>	41
6.6.1	Diseño experimental para la obtención del material biológico a utilizar en el microarreglo heterólogo.....	41
6.6.2	Extracción de ARN e hibridación del microarreglo.....	42
6.6.3	Análisis del microarreglo.....	44
6.6.4	Análisis de la expresión diferencial por PCR en tiempo real (qPCR) de la <i>miostatina</i> en los organismos de <i>Nodipecten subnodosus</i> sometidos a estrés nutricional.....	46
6.7	Análisis de la expresión de la <i>miostatina</i> por PCR cuantitativo (qPCR) en glándula digestiva, manto y músculo aductor de organismos de <i>Nodipecten subnodosus</i> experimentalmente expuestos a condiciones de estrés nutricional.....	47
6.7.1	Diseño experimental para la obtención del material biológico.....	47
6.7.2	Análisis de la expresión de la <i>miostatina</i> por qPCR en glándula digestiva, manto y músculo aductor de <i>Nodipecten subnodosus</i> expuestos experimentalmente a condiciones de estrés nutricional.....	49
6.8	Cuantificación por PCR en tiempo real (qPCR) de la expresión del transcrito de la <i>miostatina</i> en diferentes tejidos de <i>Nodipecten subnodosus</i> durante un ciclo anual de crecimiento en un sitio de alta productividad.....	50
6.8.1	Obtención de material biológico.....	50

6.8.2. Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc).....	51
6.8.3 Análisis de la expresión relativa de la <i>miostatina</i> en músculo aductor, manto, branquia, glándula digestiva y gónada de <i>Nodipecten subnodosus</i>	52
7. RESULTADOS.....	53
7.1 Secuencias de músculo aductor, glándula digestiva y gónada de <i>Nodipecten subnodosus</i>.....	53
7.1.1 Obtención de fragmentos de secuencias de la <i>miostatina</i> con presuntas deleciones..	53
7.1.2 Similitud de las secuencias obtenidas con proteínas homologas.....	55
7.2. Caracterización del transcrito completo de la <i>miostatina</i> en músculo aductor de <i>Nodipecten subnodosus</i> y obtención de transcritos parciales en glándula digestiva y gónada.....	58
7.3 Aislamiento y secuenciación del intrón II de la <i>miostatina</i> de <i>N. subnodosus</i>.....	68
7.4 Estructura del péptido maduro de la proteína <i>miostatina</i> de <i>N. subnodosus</i>.....	70
7.5 Análisis filogenético de la MSTN de <i>N. subnodosus</i> y alineamiento con proteínas homólogas.....	71
7.6 Cuantificación por PCR en tiempo real (qPCR) de los diferentes transcritos de la <i>miostatina</i> en músculo aductor de <i>N. subnodosus</i> durante un ciclo anual de crecimiento en un sitio de baja productividad y determinación de su ubicuidad.....	75
7.6.1 Variables ambientales y crecimiento durante el ciclo anual evaluado.....	75
7.6.2 Estabilidad de genes de referencia para la normalización de la expresión del gen de la <i>miostatina</i> en músculo aductor de <i>N. subnodosus</i> en un ciclo de crecimiento en un sitio de baja productividad.....	77
7.6.3 Cuantificación de la expresión del gen de la <i>miostatina</i> en la almeja mano de león <i>N. subnodosus</i> en un ciclo de crecimiento en un sitio de baja productividad.....	78
7.7 Rutas metabólicas afectadas en músculo aductor de <i>N. subnodosus</i> por condiciones experimentales de estrés nutricional.....	82
7.7.1 Identificación de rutas metabólicas afectadas en músculo aductor de organismos sometidos a estrés alimenticio.....	82
7.7.2 Estabilidad de genes de referencia para la normalización de la expresión del gen de la <i>miostatina</i> en organismos de <i>Nodipecten subnodosus</i> sometidos experimentalmente a estrés nutricional.....	90
7.7.3 Análisis de la expresión diferencial por PCR en tiempo real (qPCR) de la <i>miostatina</i> en los organismos de <i>Nodipecten subnodosus</i> sometidos a estrés nutricional.....	91
7.8 Análisis de la expresión de la <i>miostatina</i> por PCR cuantitativo (qPCR) en glándula digestiva, manto y músculo aductor de organismos de <i>Nodipecten subnodosus</i> experimentalmente expuestos a condiciones de estrés nutricional.....	93
7.8.2 Estabilidad de genes de referencia para la normalización de la expresión del gen de la <i>miostatina</i> en músculo aductor, manto y glándula digestiva de <i>N. subnodosus</i> experimentalmente expuestos a condiciones de estrés nutricional.....	93
7.8.3 Análisis de la expresión diferencial por PCR en tiempo real (qPCR) de la <i>miostatina</i> en glándula digestiva, manto y músculo aductor de organismos de <i>Nodipecten subnodosus</i> experimentalmente expuestos a condiciones de estrés nutricional.....	94

7.9 Análisis de la expresión del transcrito de la <i>miostatina</i> en diferentes tejidos de <i>Nodipecten subnodosus</i> durante un ciclo anual de crecimiento en un sitio de alta productividad.....	97
7.9.1 Estabilidad de genes de referencia para la normalización de la expresión del gen de la <i>miostatina</i> analizada en diferentes tejidos de <i>Nodipecten subnodosus</i> durante un ciclo anual de crecimiento en un sitio de alta productividad.....	97
7.9.2 Análisis de la expresión diferencial por PCR en tiempo real (qPCR) de la <i>miostatina</i> en cinco tejidos de <i>Nodipecten subnodosus</i> durante un ciclo de crecimiento.....	97
8. DISCUSIÓN.....	102
8.1. Posibles variantes de la <i>miostatina</i> en <i>N. subnodosus</i>.....	102
8.2 Secuencia de la <i>miostatina</i> de <i>Nodipecten subnodosus</i> en músculo aductor.	104
8.3 Expresión temporal de la <i>miostatina</i> en músculo aductor de <i>N. subnodosus</i> durante un ciclo anual de crecimiento en un sitio de baja productividad y análisis puntual de su ubicuidad.....	108
8.4 Expresión temporal de la <i>miostatina</i> en diferentes tejidos de <i>Nodipecten subnodosus</i> durante un ciclo anual de crecimiento en un sitio de alta productividad	111
8.5 Expresión diferencial de la <i>mstn/gdf-11</i> en organismos de <i>N. subnodosus</i> sometidos a condiciones de estrés nutricional.....	117
8.6 Evaluación del estado metabólico del músculo aductor de <i>N. subnodosus</i> a través de la expresión génica diferencial en organismos sometidos a condiciones experimentales de estrés nutricional.....	120
8.7 Cuantificación por qPCR de las posibles variantes de la <i>miostatina</i> en <i>N. subnodosus</i>.....	123
9. CONCLUSIONES.....	125
10. LITERATURA CITADA.....	126
11. ANEXOS.....	148

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	Diferentes vías de señalización de la <i>miostatina</i> (Tomado de Elkina et al., 2011).....	6
Fig. 2	Esquema general del trabajo realizado durante el presente estudio.....	18
Fig. 3	Localización de los cebadores: utilizados para el aislamiento y clonación de la secuencia parcial del gen de la <i>miostatina</i> en glándula digestiva, gónada y músculo aductor de <i>Nodipecten subnodosus</i> , los diseñados para la realización de la técnica RACE y los diseñados para la amplificación por PCR cuantitativo (qPCR) del transcrito de la <i>miostatina</i> en <i>Nodipecten subnodosus</i> . Los nucleótidos denotan la región que comprende la delección se encuentran marcadas con un cuadro.....	22
Fig. 4	Electroforesis de ARN de músculo aductor de 11 individuos utilizados para la purificación de ARN mensajero (poly A).....	24
Fig. 5	Electroforesis de ARN de glándula digestiva de 18 muestras utilizados para la purificación de ARN mensajero (poly A).....	25
Fig. 6	Modelo de hibridaciones en swap para organismos sometidos a condiciones experimentales de alimentación óptima (control) vs. sub-óptima (experimental).....	46
Fig. 7	Productos de amplificación obtenidos por PCR de punto final de glándula digestiva (carril 1, 2 y 3), gónada (carril 4, 5 y 6) y músculo aductor (carril 7 y 8) de <i>Nodipecten subnodosus</i> muestreados en Ago-09. Carril 9 corresponde al control negativo y el carril 10 a control positivo de ADNc de músculo aductor ya probado. M se refiere al marcador de tamaño.....	53
Fig. 8	Alineamiento de las secuencias de los fragmentos de 125 pb, 405 pb y 562 pb obtenidos de la amplificación de una secuencia parcial del transcrito del gen de la <i>miostatina</i> en <i>N. subnodosus</i> . Los asteriscos (*) muestran los nucleótidos similares en las tres secuencias.....	54
Fig. 9	Productos de amplificación obtenidos de gradiente de MgCl ₂ realizado por PCR de punto final de ADNc de glándula digestiva de cuatro organismos de <i>Nodipecten subnodosus</i> muestreados en Ago-09 (denominados del 1 al 4 en cada concentración de MgCl ₂). Las letras A, B, C y D se refieren a las concentraciones de 3.0, 2.5, 2.0 y 1.5 mM de MgCl ₂ respectivamente utilizadas en la amplificación. M se refiere al marcador de tamaño.....	55
Fig. 10	Traducción conceptual de la secuencia parcial de 562 pb de la <i>miostatina</i> obtenida en <i>N. subnodosus</i> . La secuencia subrayada es parte del dominio N-terminal del pro péptido. En negritas se muestra el sitio de procesamiento proteolítico (RXXR) de la MSTN. El resto de la secuencia es el dominio C-terminal que corresponde al ligando activo.....	56
Fig. 11	Traducción conceptual de la secuencia parcial de 405 pb obtenida de la MSTN de <i>N. subnodosus</i> . La marca (†) muestra donde cambia el marco abierto de lectura debido a la delección de 157 pb encontrada. Los asteriscos indican los codones de paro.....	57
Fig. 12	Traducción conceptual de la secuencia parcial de 125 pb obtenida de la <i>miostatina</i> de <i>N. subnodosus</i> . La marca (†) muestra donde cambia el marco abierto de lectura debido a la delección de 437 pb encontrada.....	57
Fig. 13	Amplificación con el par de cebadores RACEMST1-F (dirección 3') y RACEMST3-R (dirección 5') de ADNc RACE de: a) gónada en dirección 5' (carril 1) y en dirección 3' (carril 2), marcador de peso molecular (M); de glándula digestiva en dirección 5' (carril 3) y en dirección 3' (carril 4); en músculo aductor en dirección 5' (carril 5) y en dirección 3' (carril 6). b) glándula digestiva (carril 1) y de gónada (carril 2), marcador de peso molecular (M); y c) en dirección 5' de gónada (carril 2), de glándula digestiva (carril 1) y marcador de peso molecular (carril 1).....	59

- Fig. 14** Secuencia nucleotídica y su traducción conceptual a proteína de la *miostatina* de *Nodipecten subnodosus*. La secuencia codificante está representada en letras minúsculas y la traducción a aminoácidos en letras mayúsculas. La UTR 5' larga está en letras mayúsculas de color gris claro con la caja-TATA resaltada en gris claro. El uORF (upstream ORF) del UTR 5' esta subrayado con guiones. La UTR 5' corta esta subrayada. El sitio de escisión del péptido señal está resaltado en gris oscuro. El sitio de procesamiento proteolítico adicional (RRKR) y la secuencia del sitio de procesamiento proteolítico (RSKR) están resaltados en negro. Los nueve residuos de cisteínas conservados en el dominio maduro de la proteína se encuentran marcadas en recuadros de color gris oscuro. El codón de paro está indicado con un asterisco. Los sitios MBE (Musashi binding site) se muestran marcados con recuadros. Los sitios UNRbs (UNR binding site) están subrayados con doble línea. Los K-box están escritas con letras cursiva/negrita resaltadas en gris oscuro. La señal de poliadenilación (PAS) está escrita con letras cursivas subrayada..... 62
- Fig. 15** Alineamiento de UTR 3' de las especies de pectínidos mostrando los sitios con K-boxes: *Argopecten irradians* (JN684903.1), *A. purpuratus* (KC771285.1), *A. ventricosus* (datos no publicados), *Chlamys farreri* (EU563852.2) y *Nodipecten subnodosus* (KF471120). Las K-boxes están mostradas en recuadros. La secuencia con un sitio de reconocimiento de miRNA (ACTGTGA) está mostrada con letras cursivas/negritas..... 62
- Fig. 16** Alineamiento de la secuencias nucleotídicas de la *miostatina* obtenidas de músculo aductor, gónada y glándula digestiva de *Nodipecten subnodosus* a partir de la amplificación con el primer juego de cebadores realizada. En un recuadro se observan los dos sitios de inicio de transcripción observados..... 64
- Fig. 17** Alineamiento de la secuencias de la MSTN obtenidas de músculo aductor y de glándula digestiva de *Nodipecten subnodosus* de 459 aminoácidos, con la secuencia obtenida de gónada de 284 aminoácidos. Los asteriscos (*) identifican los aminoácidos similares, (:) indican las sustituciones conservadas y (.) indican las sustituciones semi-conservadas entre las tres secuencias. Con (↓) se identifican los nueve residuos de cisteínas conservados. El sitio de procesamiento proteolítico se enmarca con un cuadro..... 65
- Fig. 18** Amplificación con los cebadores MSTN_2-F (dirección 3') y MSTN_2-R (dirección 5') con ADNc de: a) músculo aductor (carril 1), de glándula digestiva (carril 2) y de gónada (carril 3); marcador de peso molecular (M); y b) de músculo aductor (carril 1) y de gónada (carril 2), marcador de peso molecular (M)..... 66
- Fig. 19** Amplificación con los cebadores MSTN-F (dirección 3') y RACEMSTN2-R (dirección 5') de ADNc de: a) glándula digestiva (carril 1); marcador de peso molecular (M); y b) glándula digestiva (carril 1); marcador de peso molecular (M)... 67
- Fig. 20** Alineamiento de la secuencias de la MSTN obtenidas de glándula digestiva de *Nodipecten subnodosus*. Los asteriscos (*) identifican los aminoácidos similares. El sitio de procesamiento proteolítico se enmarca con un cuadro. Al final de la secuencia de 170 aminoácidos se presenta el codón de paro (*)...... 68
- Fig. 21** Electroforesis de la amplificación de ADN genómico de músculo aductor de *N. subnodosus*. Orden de muestras 1) Marcador, 2 al 5) individuo 1-4, 6) control negativo, 7) ADNc de músculo aductor como control positivo..... 69
- Fig. 22** Secuencia obtenida de la amplificación del ADN genómico de músculo aductor de *N. subnodosus*, flanqueada por el 2º y 3er exón en letras minúsculas subrayadas. En itálicas se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a las secuencias de cada exón mostradas. Los recuadros presentan los límites del exón/intrón..... 70

Fig. 23	Representación gráfica de la estructura secundaria de las proteínas de: a) Mioglianina de <i>D. melanogaster</i> , b) GDF-8 de <i>Homo sapiens</i> , y c) <i>Miostatina</i> de <i>N. subnodosus</i> . Las hélices alfa están de color rojo, las laminas β en azul, los giros β en color gris y los residuos de cisteína en amarillo.....	71
Fig. 24	Árbol filogenético de la MSTN de <i>Nodipecten subnodosus</i> realizado con MEGA 6.0, basado en la secuencia conservada de aminoácidos de varios invertebrados. El árbol fue construido usando el algoritmo de Neighbor-joining, con 10,000 repeticiones y el modelo WAG. Las filogenias fueron enraizadas con la proteína GDNF. Las subfamilias de proteínas están separadas por colores. La MSTN está marcada en azul, donde se encuentra agrupada la MSTN de <i>N. subnodosus</i> . Los nombres de las secuencias incluyen el número GI (Geninfo) de NCBI.....	73
Fig. 25	Alineamiento de proteínas homólogas/ortólogas de la MSTN/GDF-11 y Mioglianina. Los aminoácidos idénticos y conservados están marcados con (*). Los recuadros en gris muestran el sitio de procesamiento proteolítico (RXXR). Los triángulos indican las nueve cisteínas presentes en todas las <i>miostatinas</i> miembros de la familia de TGF- β , y el dominio C-terminal altamente conservado se encuentra subrayado.....	74
Fig. 26	Incremento en el peso observado en <i>Nodipecten subnodosus</i> durante el crecimiento. Incremento en el peso de la biomasa (A) fue estimado a partir de mayo 2008 a agosto de 2009, el incremento en el peso del músculo aductor (B) fue estimado de julio de 2008 a agosto de 2009. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias y los intervalos de confianza. La temperatura y la concentración de clorofila-a durante el periodo de crecimiento se muestran en la figura (C).....	76
Fig. 27	Estabilidad de los genes de referencia estimada con RefFinder con base en los métodos Delta Ct, Bestkeeper, NormFinder y GeNorm. Los genes más estables fueron utilizados para la normalización de la cuantificación de la expresión del gen de la <i>miostatina</i> de <i>N. subnodosus</i> en músculo aductor durante un ciclo de crecimiento.....	77
Fig. 28	Estabilidad de los genes de referencia estimada con RefFinder con base en los métodos Delta Ct, Bestkeeper, NormFinder y GeNorm. Los genes más estables fueron utilizados para la normalización de la cuantificación de la expresión del gen de la <i>miostatina</i> de <i>N. subnodosus</i> en músculo aductor, manto, branquia, glándula digestiva y gónada para determinación de ubicuidad.....	78
Fig. 29	Expresión relativa de la <i>miostatina</i> (retransformada de logaritmos) en músculo aductor de <i>N. subnodosus</i> durante su crecimiento (Julio-2008 a Agosto-2009). La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_1-F y R. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza.....	79
Fig. 30	Expresión relativa de la <i>miostatina</i> (retransformada de logaritmos) en cinco tejidos de la almeja mano de león muestreadas en Agosto-2009. La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_1-F y R. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza.....	80
Fig. 31	Expresión relativa de la <i>miostatina</i> (retransformada de logaritmos) en músculo aductor de <i>N. subnodosus</i> durante su crecimiento (Julio-2008 a Agosto-2009). La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_2-F y R. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza.....	81

Fig. 32	Expresión relativa de la <i>miostatina</i> (retransformada de logaritmos) en cinco tejidos de la almeja mano de león muestreadas en Agosto-2009. La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_2-F y R. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan la media con los intervalos de confianza.....	81
Fig. 33	Mapa metabólico de las vías de señalización donde están involucrados los genes sobre-regulados (azul) y sub-regulados (rojo) identificados con el microarreglo heterólogo de <i>D. melanogaster</i> hibridado con ADNc de músculo aductor de organismos de <i>N. subnodosus</i> sometidos experimentalmente a estrés alimenticio. Las vías de señalización se muestran en diferente color: en verde el metabolismo de lípidos, en rojo el metabolismo de los ácidos grasos, en amarillo la beta oxidación, en azul el metabolismo de los carbohidratos, en negro la oxidación fosforilativa y en morado el metabolismo de los aminoácidos y nucleótidos.....	84
Fig. 34	Procesos biológicos con base en términos ontológicos agrupados con el Sistema de Clasificación PANTHER. (A) Primer nivel de categorización de los procesos biológicos y (B) Categorización de los procesos metabólicos. Barras gris claro muestran los genes sub expresados y las barras gris oscuro los genes sobre expresados.....	85
Fig. 35	Procesos metabólicos primarios agrupados por PANTHER Classification System dentro procesos metabólicos. Barras gris claro muestran los genes sub expresados y las barras gris oscuro los genes sobre expresados.	86
Fig. 36	Estabilidad de los genes de referencia estimada con RefFinder con base en los métodos Delta Ct, Bestkeeper, NormFinder y GeNorm. Los genes más estables fueron utilizados para la normalización de la cuantificación de la expresión del gen de la <i>miostatina</i> de <i>N. subnodosus</i> en músculo aductor de organismos sometidos experimentalmente a estrés nutricional.....	91
Fig. 37	Expresión relativa de la <i>miostatina</i> (retransformada de logaritmos) en músculo aductor, manto, branquia, glándula digestiva y gónada de <i>N. subnodosus</i> de organismos expuestos a condiciones experimentales de estrés nutricional. La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_1-F y R. Barras gris oscuro grupo de alto alimento y barras gris claro grupo de bajo alimento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza.....	92
Fig. 38	Expresión relativa de la <i>miostatina</i> (retransformada de logaritmos) en músculo aductor, manto, branquia, glándula digestiva y gónada de <i>N. subnodosus</i> de organismos expuestos a condiciones experimentales de estrés nutricional. La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_2-F y R. Barras gris oscuro grupo de alto alimento y barras gris claro grupo de bajo alimento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza.....	93
Fig. 39	Estabilidad de los genes de referencia estimada con RefFinder con base en los métodos Delta Ct, Bestkeeper, NormFinder y GeNorm. Los genes más estables fueron utilizados para la normalización de la cuantificación de la expresión del gen de la <i>miostatina</i> en glándula digestiva, manto y músculo aductor de organismos de <i>Nodipecton subnodosus</i> experimentalmente expuestos a condiciones de estrés nutricional.....	94
Fig. 40	Expresión relativa de la <i>miostatina</i> (retransformada de logaritmos) en músculo aductor, manto y glándula digestiva de <i>N. subnodosus</i> de organismos expuestos a condiciones experimentales de estrés nutricional. La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_1-F y R. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza.....	96

- Fig. 41** Expresión relativa de la *miostatina* (retransformada de logaritmos) en músculo aductor, manto y glándula digestiva de *N. subnodosus* de organismos expuestos a condiciones experimentales de estrés nutricional. La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_2-F y R. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza..... 96
- Fig. 42** Estabilidad de los genes de referencia estimada con RefFinder con base en los métodos Delta Ct, Bestkeeper, NormFinder y GeNorm. Los genes más estables fueron utilizados para la normalización del gen de la *miostatina* analizada en cinco tejidos de *Nodipecten subnodosus* durante un ciclo de crecimiento..... 97
- Fig. 43** Expresión relativa de la *miostatina* en cinco tejidos de *N. subnodosus* durante su crecimiento (Febrero-2013 a octubre-2013). La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_1-F y R. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza. 100
- Fig. 44** Expresión relativa de la *miostatina* en cinco tejidos de *N. subnodosus* durante su crecimiento (Febrero-2013 a octubre-2013). La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_2-F y R. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza. 101

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Cebadores utilizados para el aislamiento y clonación de las secuencias parciales del gen de la <i>miostatina</i> en glándula digestiva, gónada y músculo aductor de <i>Nodipecten subnodosus</i>	23
Tabla II	Genes de referencia evaluados para su estabilidad en músculo aductor de <i>Nodipecten subnodosus</i>	41
Tabla III	Vías metabólicas identificadas con KEGG mapper en los que se encuentran involucrados los genes diferencialmente expresados identificados con el microarreglo heterólogo de <i>D. melanogaster</i> hibridado con ADNc de músculo aductor de organismos de <i>N. subnodosus</i> experimentalmente expuestos a estrés nutricional.....	83
Tabla IV	Procesos biológicos identificados por términos ontológicos con WebGestalt.....	87
Tabla V	Rutas metabólicas identificadas con base en la base de datos KEGG con WebGestalt.....	87
Tabla VI	Genes diferencialmente expresados dentro de los Procesos Metabólicos de Lípidos.	88
Tabla VII	Genes diferencialmente expresados dentro de los Procesos Metabólicos de Carbohidratos.....	89
Tabla VIII	Genes diferencialmente expresados dentro de los Procesos donde están involucrados los Peroxisomas.....	90

1. INTRODUCCIÓN

La almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* es una de las tres especies de pectínidos de importancia comercial que se encuentran en México y la más grande en aguas tropicales del Oeste Americano (Keen, 1971; Keen y Coan, 1974). El interés en esta especie radica en las tallas que alcanza (20 cm) y el peso (150 gr) de su músculo aductor (Morales-Hernández y Cáceres-Martínez, 1996; Koch *et al.*, 2005). La mayor abundancia se localiza en la Laguna Ojo de Liebre, BCS, donde se realiza principalmente la pesquería de esta especie, aunque también se encuentra en las costas del Golfo de California, siendo estas identificadas como dos poblaciones genéticamente distintas (Petersen *et al.*, 2010). Debido a que alcanza su talla comercial en un tiempo relativamente corto de dos años y a las características organolépticas que se atribuyen al músculo aductor es considerada como una especie con potencial para su cultivo en México (Félix-Pico *et al.*, 1999; Koch *et al.*, 2005; Ponce-Díaz *et al.*, 2011). Sin embargo, la obtención de juveniles para la industria es muy limitada, principalmente porque la supervivencia es estadios tempranos del desarrollo no ha logrado ser optimizada (Mazón-Suástegui *et al.*, 2011). Hasta el momento, se han realizado cultivos experimentales, pilotos y comerciales en diferentes bahías y lagunas en ambas costas de la Península de Baja California (Freites *et al.*, 2011).

En esta especie se han llevado a cabo estudios de crecimiento y reproducción en poblaciones naturales (Arellano-Martínez *et al.*, 2004b), y en condiciones de cultivo (Racotta *et al.*, 2003; Maldonado-Amparo *et al.*, 2004; Arellano-Martínez *et al.*, 2011), de composición bioquímica (Palacios *et al.*, 2005; Palacios *et al.*, 2007; Racotta *et al.*, 2008), de efectos de la salinidad, la temperatura y la disponibilidad de alimento (Barrios-Ruíz *et al.*, 2003; Arellano-Martínez *et al.*, 2004a; Roldán-Carrillo *et al.*, 2005). Estudios genéticos como el desarrollo de marcadores moleculares tipo microsatélites (Ibarra *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2009), la evaluación de las consecuencias genéticas de desoves en masa como práctica utilizada en la acuicultura (Petersen *et al.*, 2008) y la diversidad genética de

poblaciones en cultivo y silvestres (Petersen *et al.*, 2010) han sido llevados a cabo en *N. subnodosus*. Hasta el momento son muy pocos los estudios genómicos realizados en esta especie. Llera-Herrera *et al.* (2012a) identifica por medio de librerías sustractivas (SSH) genes diferencialmente expresados durante la espermatogénesis de organismos en dos estadios reproductivos diferentes (inactivos y maduros) de *N. subnodosus*. Por otro lado, al realizar análisis de expresión génica entre diferentes tejidos de *N. subnodosus*, Llera-Herrera *et al.* (2012b) identifican que uno de los genes que potencialmente sería utilizado como gen de referencia (α -*Tubulina*), fue específica y altamente expresado sólo en la porción masculina de la gónada, además del músculo aductor en esta especie. Con la finalidad de encontrar herramientas moleculares que puedan ser empleadas en la mejora genética de *N. subnodosus*, Petersen *et al.* (2012) desarrollan el primer mapa de ligamiento con potencial para identificar QTLs (del inglés Quantitative Trait Loci) para caracteres de crecimiento tales como el peso, el tamaño, la masa total o del músculo aductor. Sin embargo, los procesos moleculares que regulan el crecimiento del músculo aductor en respuesta a factores ambientales como es la disponibilidad de alimento en esta especie aún no han sido estudiados.

2. ANTECEDENTES

El músculo aductor y los factores que controlan su crecimiento en esta especie son de particular interés dado que es la parte del organismo que es comercializada para consumo. Diversos estudios han determinado la relación que existe entre la disponibilidad de alimento y la reproducción de *N. subnodosus*. En esta especie ya se ha demostrado que la movilización y almacenamiento de sustratos metabólicos del músculo aductor hacia la gónada para la reproducción depende de la disponibilidad de alimento. Arellano-Martínez *et al.* (2004a) reportan que en condiciones de baja disponibilidad de alimento se observa la disminución del peso muscular durante la gameto-vitelogénesis, con un decremento en el

contenido de proteínas y carbohidratos. Por otro lado se ha reportado que en condiciones óptimas de alimento en el medio ambiente, al no ser necesaria la movilización de energía almacenada del músculo aductor hacia la gónada para formación de los gametos, no se observa la disminución en el peso del músculo aductor o en las reservas de carbohidratos (Racotta *et al.*, 2003; Palacios *et al.*, 2005, 2007). Sin embargo, no sólo el uso de los sustratos metabólicos almacenados en el músculo aductor para la reproducción provoca la reducción del tamaño del mismo, ya que la productividad primaria en el sitio donde esta especie se encuentre durante su ciclo de vida, particularmente durante las etapas de crecimiento, es también importante (Maldonado-Amparo *et al.*, 2004; Racotta *et al.*, 2008; Ramírez-Arce, 2009). La respuesta fisiológica de *N. subnodosus* a los cambios en la disponibilidad de alimento como una consecuencia de las variaciones de la temperatura en los sitios de crecimiento o cultivo muestra que esta especie tiene una amplia capacidad adaptativa al cambio. Sin embargo, hasta el momento es desconocido cuales son los genes involucrados en el metabolismo fisiológico así como su relación con el crecimiento muscular.

Las condiciones ambientales y la alimentación son factores determinantes para el desarrollo de los organismos en cualquier ambiente. Cuando las condiciones ambientales limitan la disponibilidad de nutrientes, los organismos detienen o ajustan su crecimiento con la finalidad de mantener las funciones vitales utilizando sus reservas energéticas, regresando a su estado normal de desarrollo cuando los nutrientes son abundantes (Puig y Tjian, 2006). El crecimiento es el resultado de la proliferación y crecimiento de células, las cuales requieren de macromoléculas como carbohidratos, lípidos y proteínas, así como un adecuado sistema de control metabólico que indicará al organismo las necesidades de carbono, nitrógeno y energía para generar dicho crecimiento. Cuando los nutrientes son escasos, la producción de biomasa es detenida y el metabolismo se adapta, enciende los diferentes mecanismos reguladores y utiliza las reservas adecuadas para el mantenimiento de la homeostasis (Van der Heiden *et al.*, 2009). La falta de alimento induce un estrés crónico que se traduce en una disminución del

crecimiento, en el cual también se observa una disminución en la disponibilidad de carbono y nitrógeno indicando un incremento del catabolismo (Wunderink *et al.*, 2012) y el músculo es el principal tejido que sufre alteraciones en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes (Hornick *et al.*, 2000). En animales acuáticos los metabolitos de reserva almacenados en el músculo, como el glucógeno y los lípidos, son utilizados para soportar requerimientos metabólicos en otros tejidos (Martínez *et al.*, 2000). Las macromoléculas obtenidas de la degradación de estos materiales de reserva van a satisfacer las necesidades metabólicas requeridas para mantener el buen funcionamiento del organismo. Sin embargo, hasta el momento estos mecanismos no han sido estudiados en *N. subnodosus*.

Dentro de la genómica funcional, actualmente existen diferentes herramientas que permiten explorar la expresión de genes a gran escala. Por ejemplo, la tecnología de microarreglos es una herramienta efectiva para el *screening* de una gran cantidad de transcritos (Gracey y Cossins, 2003). Hasta el momento este tipo de herramientas capaces de caracterizar patrones en los cambios de expresión, han sido diseñadas solo para organismos modelo o de aquellos organismos de los cuales ya se tiene la suficiente información genómica para el diseño de un microarreglo. Sin embargo, estos microarreglos de organismos modelo han permitido también estudiar respuestas transcriptómicas diferenciales a diversas condiciones en organismos filogenéticamente relacionados (Darby *et al.*, 2011). Esto es, se han realizado diferentes estudios por medio de hibridaciones heterólogas de microarreglos en una variedad de organismos (Sauer *et al.*, 2004; Bagnaresi *et al.*, 2008; Osuna-Jiménez *et al.*, 2009; Darby *et al.*, 2011). Si bien no es posible obtener el total de los miles de genes involucrados en las distintas vías de señalización que se ven alteradas por el cambio en las condiciones ambientales o nutricionales, sí se obtienen cientos de estos que contienen secuencias altamente conservadas entre especies que permiten una hibridación cruzada exitosa (Larade y Storey, 2009).

Estudios de expresión génica y morfo-histológicos del músculo aductor en *N. subnodosus* han indicado que la respuesta de pérdida en peso muscular resulta de una atrofia en respuesta a condiciones nutricionales subóptimas y de altas temperaturas, y está directamente asociada con la sobreexpresión del gen ortólogo de la *miostatina* de vertebrados en músculo aductor (Morelos-Castro, 2011), un gen perteneciente a la familia de los TGF- β cuya proteína (una citocina o citoquina) en vertebrados ha sido extensamente estudiada en un contexto de crecimiento, determinando que su función es controlar negativamente (inhibir) el crecimiento muscular (McPherron *et al.*, 1997). Hoy en día se sabe que el papel de la *miostatina* como un regulador negativo del crecimiento muscular en vertebrados se deriva de la acción que este gen ejerce sobre diferentes vías de señalamiento del metabolismo (Huang *et al.*, 2011). La *miostatina* (1) participa en la reducción de la masa muscular o atrofia muscular bloqueando la miogénesis e inhibiendo la síntesis de proteínas a través de la regulación de la vía de señalamiento Akt/mTOR, una vía crítica mediando tanto la hipertrofia como la atrofia en músculo esquelético de vertebrados (Amirouche *et al.*, 2009); (2) regula el metabolismo de la glucosa induciendo a la glucólisis e inhibiendo la síntesis de glucógeno en células esqueléticas musculares. La inducción de la glucólisis por la *miostatina* ocurre a través de la activación de la vía de señalamiento de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), induciendo la expresión de genes del metabolismo de la glucosa (Chen *et al.*, 2010); (3) la sobreexpresión de la *miostatina* en músculo induce una acumulación de grasas (obesidad en vertebrados), la cual es explicada por la inducción de la glucólisis y el papel que esta última tiene en la lipogénesis o síntesis de grasas (Guo *et al.*, 2009). Las vías de señalización que incluyen a estos mecanismos donde se encuentra involucrada la *miostatina* se muestran en la figura 1.

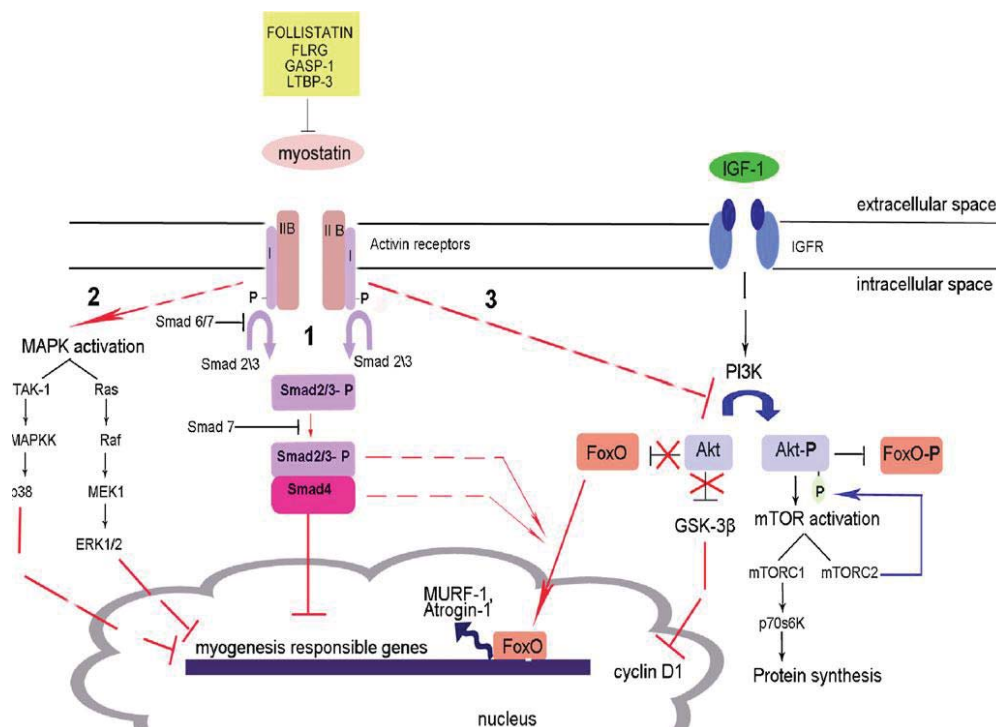


Figura. 1. Diferentes vías de señalización de la *miostatina* (Tomado de Elkina *et al.*, 2011).

2.1 La familia de la miostatina

La superfamilia de los factores transformantes de crecimiento Beta (TGF- β) es reconocida como una de las más grandes familias de péptidos que regulan diversas actividades biológicas, tales como la diferenciación, proliferación y muerte celular (Kingsley, 1994). En ella se incluyen activinas, factores de crecimiento y diferenciación (GDF por sus siglas en inglés), proteínas morfogenéticas del hueso (BMP por sus siglas en inglés), además de isoformas del factor transformante de crecimiento Beta (TGF- β) las cuales controlan el desarrollo y homeostasis de la mayoría de los tejidos de los organismos pluricelulares (Massagué, 1998; Gálvez-Gastélum *et al.*, 2004). La miostatina se encuentra clasificada dentro de esta superfamilia de TGF- β .

El gen de la *miostatina* (*mstn*) en vertebrados, originalmente llamado *Factor 8 de Crecimiento y Diferenciación* (*gdf-8* por sus siglas en inglés) fue primero

descubierto y caracterizado en ratones por McPherron *et al.* (1997), demostrando su papel como regulador negativo (inhibidor) del crecimiento, al producir por mutagénesis dirigida, un ratón mutante (MSTN^{-/-}) sin la capacidad de sintetizar la proteína MSTN. Este organismo mutante, a diferencia de los individuos control, presentó el fenotipo de “doble musculatura”, con una masa muscular de dos a tres veces mayor que los controles no mutantes debido al incremento en el número de fibras musculares y al incremento en el tamaño de las mismas, fenómenos que se conocen como hiperplasia e hipertrofia respectivamente.

La organización genómica del gen de la *miostatina* ha sido caracterizada en diferentes especies de mamíferos incluyendo al humano (González-Cadavid *et al.*, 1998) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2660>, aves y peces (Keer *et al.*, 2005; Garikipati *et al.*, 2006; Mosher *et al.*, 2007; Stinckens *et al.*, 2008; Dall’Ollio *et al.*, 2010). Para todas las especies de vertebrados se ha reportado que el gen consta de tres exones y dos intrones, y que el tamaño de cada uno de los exones e intrones es similar entre mamíferos y aves, aunque en peces los tamaños de los intrones son diferentes (Rodgers y Garikipati, 2008).

La estructura que tiene la proteína de la MSTN en vertebrados consta de: (a) un pro-dominio N-terminal donde se encuentra un núcleo hidrofóbico de aminoácidos que funciona como una secuencia señal para la secreción, (b) un sitio con la secuencia de aminoácidos RSRR (Arg-Ser-Arg-Arg) que corresponde al sitio proteolítico de la proteína y finalmente, (c) un dominio C-terminal de 109 aminoácidos que se conoce como el ligando activo, que contiene nueve residuos de cisteína ubicados a lo largo de la secuencia (McPherron y Lee, 1996; Saharinen *et al.*, 1996; McPherron *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2000). El procesamiento proteolítico de la miostatina (MSTN) da como resultado la forma madura pero inactiva de la misma, que circula como un complejo latente del homodímero de dominio C-terminal y el propéptido asociado a la latencia (LAP por sus siglas en inglés) (Thomas *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 2002). El dímero de las unidades C-terminal en la MSTN madura está unido por un puente disulfuro de la

sexta cisteína y el resto de los residuos de cisteína facilitan la formación de una estructura intermolecular llamada nudo de cisteína (*cysteine knot structure*) característica de otros miembros de la familia de TGF- β (Vitt *et al.*, 2001). Existen estudios que indican que el propéptido es importante para el correcto plegamiento de la proteína, permitiendo la dimerización del dominio C-terminal de la MSTN (Gray *et al.*, 1990; Jin *et al.*, 2004; Funkestein y Rebhan, 2007). Se ha demostrado que el dímero del dominio C-terminal se forma *a priori* de la secreción de la MSTN precursora, lo que ha permitido sugerir que éste es formado después de la traducción (McPherron *et al.*, 1997; Lee y McPherron, 2001). La activación final de la MSTN requiere de un corte adicional que ocurre en la región del propeptido, y es llevado a cabo por metaloproteasas (Wolfman *et al.*, 2003).

En peces se han reportado varios parálogos del gen ortólogo de la *miostatina* en vertebrados mayores, que presumiblemente aparecieron debido a un proceso de duplicación genómica durante la divergencia de los teleósteos (Amores *et al.*, 1998; Postlethwait *et al.*, 1998), encontrándose así dos genes en algunas especies de peces, el *miostatina-1* y *miostatina-2* (Garikipati *et al.*, 2006; Maccatrozzo *et al.*, 2001; Biga *et al.*, 2005). En los salmónidos se ha reportado que estos dos genes sufrieron una duplicación adicional debido al proceso de tetraploidización (Phillips y Ráb, 2001; Kerr *et al.*, 2005) por lo que esto sugirió que tenían cuatro genes distintos: dos *mstn-1* (*mstn-1a* y *mstn-1b*) y dos *mstn-2* (*mstn-2a* y *mstn-2b*). En estudios posteriores, Garikipati *et al.* (2007) al analizar las secuencias de los cuatro genes de la *miostatina* que se conocían en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* hasta ese momento, encuentran que existen diferencias en el dominio C-terminal entre los genes *mstn-2a* y *mstn-2b*, las cuales consisten en la sustitución de codones de una metionina por lisina y una histidina por arginina. La comparación entre los parálogos *mstn-2a* y *mstn-2b*, mostraron que el gen *mstn-2b* carece de 51 pb (17 aminoácidos) en su secuencia en comparación al gen *mstn-2a*, y tiene dos codones de terminación dentro del primer exón, lo que sugiere que este gen es un pseudogen. Ese trabajo hace por primera vez referencia a la existencia de pseudogenes y de transcritos no procesados

(*unspliced*) de la *miostatina* que no habían sido reportados en otros vertebrados. Por otro lado, en especies de aves se han descrito dos isoformas de la *miostatina* conocidas como *mstn-a* y *mstn-b* (Castelhano-Barbosa *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 2005). Adicionalmente, en el pato común *Anas platyrhynchos* (Huang *et al.*, 2011) se han descrito dos transcritos alternativos de la *miostatina* que se expresan durante el desarrollo embrionario del músculo esquelético denominados como *mstn-c* y *mstn-d*. En dicho trabajo los autores analizan la secuencia de los cuatro transcritos, encontrando que estos últimos presentan una delección de 251 aminoácidos respectivamente, en relación a *mstn-a* el cual es el único que codifica para una MSTN completa de 375 aminoácidos. La traducción conceptual de dichos transcritos demuestra la presencia de proteínas truncas, las cuales pierden el sitio de procesamiento proteolítico y el extremo C-terminal que da origen a la parte activa de la proteína debido a un codón de paro en el aminoácido 373. La isoforma *mstn-d* ya había sido descrita como el resultado de un transcrito que codifica para una proteína trunca de 276 aminoácidos, la cual pierde parte del propéptido. Con estos resultados los autores sugieren que los transcritos *mstn-b* y *mstn-c* podrían ser antagonistas de los otros dos transcritos y en conjunto mantener el desarrollo normal del músculo en esta especie.

2.2 Ortólogos de la *miostatina* en Invertebrados

En diversas especies de moluscos, genes pertenecientes a Factores Transformantes de Crecimiento Beta (TGF- β) han sido identificados (Fleury *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2012), y en el genoma del ostión *Crassostrea gigas* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/proteins/10758?genome_assembly_id=39669&gi=-1) se han identificado diversos genes pertenecientes a esta superfamilia, incluyendo dos genes ortólogos de la *miostatina* de vertebrados, anotados como '*growth/differentiation factor 8-like*', o *gdf-8-like*.

En *Nodipecten subnodosus* el gen ortólogo de la *miostatina* (*mstn*) en vertebrados, ha sido parcialmente aislado (Morelos-Castro, 2011). De hecho, el transcrito del

gen ortólogo de la *miostatina* ha sido caracterizado en diversos artrópodos (Covi *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010) y bivalvos pectínidos (Kim *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2010) de interés comercial como *Azumapecten farreri* (Hu *et al.*, 2010) y *Argopecten irradians* (Guo *et al.*, 2011), especies en las que también el gen ya ha sido caracterizado completamente. En estas especies se reporta que la proteína tiene alta similitud con vertebrados. En *Azumapecten farreri* el tamaño de cada exón es de 586, 380 y 408 pb respectivamente, y los intrones que los separan son de 5086 y 1518 pb. En la región promotora se encuentran tres sitios de inicio de transcripción, así como secuencias de reconocimiento de factores de transcripción o elementos de regulación-*cis* específicos (E-box, MEF2, MTBF y COMP) que son requeridos para la transcripción específica de genes en músculo (Hu *et al.*, 2010).

Estudios evaluando la expresión de la *miostatina* en diferentes invertebrados, incluyendo pectínidos como la almeja mano de león, han sido realizados. El primer transcrito identificado fue en *A. irradians*, el cual es traducido a una proteína de aproximadamente 382 aminoácidos (Kim *et al.*, 2004). Kim *et al.* (2004) al realizar un análisis cuantitativo de la expresión de la *miostatina* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR en tiempo real) 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 el gen de la *miostatina* también tenga una importante participación en el crecimiento del músculo y en el desarrollo de los moluscos bivalvos. En otro pectínido, *Azumapecten farreri*, Hu *et al.* (2010), al igual que Kim *et al.* (2004) encuentran que la mayor expresión del gen de la *miostatina* ocurre en músculo, y que es el músculo estriado, en comparación del liso, donde se observó la mayor expresión de la *miostatina*, seguido del manto, pero con una menor expresión. De igual manera Guo *et al.* (2012) reportan el gen y una proteína de mayor tamaño en *Argopecten irradians*, encontrando también que la expresión de la *miostatina* en diferentes tejidos de la almeja fue mayor en el músculo aductor seguido de manto y branquia. En *Argopecten purpuratus* (Morales-Collío *et al.*, 2014) reportan y evalúan la expresión de la *miostatina* en

esta especie en gónada porción masculina y femenina, así como en branquias y músculo, siendo éste último el que presenta una mayor expresión de este gen seguido de la gónada, sin presentar diferencias significativas en su expresión. Por otro lado, en el pectínido *Patinopecten yessoensis* (Kim *et al.*, 2007) se reporta que la mayor expresión de este gen se observa en branquias seguido de la expresión en músculo aductor, siendo el único pectínido en el cual se reporta una alta expresión de la *miostatina* en otro tejido que no es músculo aductor.

En *Nodipecten subnodosus*, Morelos-Castro (2011) encontró que el gen de la *miostatina* se expresa en todos los tejidos de la almeja tal como se ha reportado en otras especies de moluscos pectínidos, pero la expresión observada en otros tejidos que el músculo aductor fue significativamente mayor que lo reportado previamente en *C. farreri* y *A. irradians*, particularmente la expresión encontrada en glándula digestiva y gónada. Sin embargo se desconoce si esto es consecuencia de la expresión de formas alternas de la *miostatina* (pseudogen o variantes de splicing). En otros moluscos de interés comercial también ha sido reportada la expresión de la *miostatina*. Por ejemplo, en *Mytilus chilensis* (Nuñez-Acuña y Gallardo-Escárate, 2014) ha sido reportada una proteína de 418 aminoácidos que presenta una expresión ubicua en varios tejidos, siendo la gónada y el manto los tejidos que presentan la mayor expresión. En ostras perleras como *Pinctada fucata* (Li y Li, 2014) recientemente ha sido identificada la *miostatina* en esta especie reportando que, al igual que en pectínidos la mayor expresión se observó en el músculo aductor seguido de las branquias. Por último, en la almeja navaja *Sinonovacula constricta* (Niu *et al.*, 2014) es reportado que la mayor expresión de la *miostatina* se obtiene en el pie.

En crustáceos, Covi *et al.* (2008) observan que los transcritos del gen identificado como el ortólogo de la *miostatina* se encuentran en varios tejidos del cangrejo *Gecarcinus lateralis*, siendo más abundante en el músculo esquelético y en el corazón. Es en este crustáceo en el único invertebrado donde se han encontrado expresadas en algunos tejidos al menos dos isoformas alternas a la de la

miostatina completa, aunque diferencias en expresión de las isoformas en un contexto del ciclo de vida y muda no fueron evaluadas. Estos autores concluyen que este gen tiene una importante participación en la regulación del crecimiento muscular principalmente durante la intermuda, cuando el crecimiento del organismo está restringido por el exoesqueleto. De igual manera, en el cangrejo *Eriocheir sinensis* (Kim *et al.*, 2009) caracterizan y reportan que la *miostatina* en esta especie es altamente expresada en el tejido muscular además de expresarse en otros tejidos como el corazón. Esto mismo ha sido observado en la langosta *Homarus americanus* por MacLea *et al.* (2010), quienes además de demostrar la ubicuidad de la expresión del gen de la *miostatina* en tejidos de esta especie, demuestran que este gen es regulado transcripcionalmente durante la muda, cuando se ve incrementada la expresión de la *miostatina*, 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, infiriendo que esto induce al crecimiento del músculo esquelético principalmente. Así mismo, en el camarón *Pandalopsis japonica* (Kim *et al.*, 2010) se ha observado que la ablación de uno de los dos tallos oculares, donde se localiza el órgano-X o glándula sinusal y la hormona inhibidora de la muda (MIH), y que resulta en la inducción de la muda, produce una reducción inmediata de los niveles de transcrito de la *miostatina* en tejidos como branquias y corazón, sugiriendo que es posible que exista una relación de la expresión de la *miostatina* con la ecdisis. Adicionalmente mencionan que en esta especie el gen de la *miostatina* 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 como el ganglio torácico. En *Penaeus monodon*, De Santis *et al.* (2011a) identifican y caracterizan al gen ortólogo de la *miostatina* de vertebrados, denominándolo *miostatina/GDF11* como resultado de observaciones tras la evaluación de su expresión post-inyección de ARN de doble cadena (dsRNA por sus siglas en inglés), donde encontraron que la disminución

del transcrito *miostatina*/GDF11 resultó en una reducida tasa de crecimiento comparado con el grupo control. Estos resultados fueron atribuidos por los autores a un “presunto” rol de regulación positiva de este gen en esta especie, aunque sin presentar mayores evidencias. Por su parte, Qian *et al.* (2013) caracterizan y analizan la expresión de myostatin/GDF11 en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, en donde tras inducir la muda observan una expresión diferencial entre los tejidos analizados, mencionando que las diferentes respuestas están relacionadas con las hormonas ecdisteroides. Sin embargo, cuando utilizan dsRNA para silenciar este gen en *L. vannamei* los efectos esperados de hiperplasia observados en vertebrados no fueron obtenidos, y por el contrario, se observaron efectos adversos sobre el crecimiento del músculo y la muda en esta especie (Lee *et al.*, 2015). En el camarón de agua dulce *Macrobrachium nipponense* (Shen *et al.*, 2015) reportan la secuencia completa de *miostatina*/GDF-11, su expresión predominante en el músculo abdominal (‘cola’) y el incremento de su expresión en estadios de postmuda. Adicionalmente, al igual que en *P. japonica* reportan variaciones en su expresión después de la ablación del pedúnculo ocular, concluyendo que puede tener un rol en la muda y ser regulada por hormonas secretadas en ese órgano.

En síntesis, aunque se han realizado diferentes estudios en moluscos y artrópodos, hasta el momento no está claro si la MSTN tiene: (1) la misma función de regulador negativo del crecimiento muscular que ya ha sido demostrada en vertebrados, y (2) si tiene la misma función en los diferentes tejidos de los organismos o si es la misma isoforma del gen de la *miostatina* la que se encuentra expresada en diferentes tejidos y etapas del ciclo de vida. Por lo que en el presente trabajo se propone además de la caracterización completa del transcrito de la *miostatina* en *N. subnodosus*, evaluar la expresión de la *miostatina* en respuesta a diferentes condiciones ambientales y nutricionales, en diferentes tejidos y etapas de crecimiento para aportar conocimiento sobre la asociación de este gen con el crecimiento de esta especie y otros moluscos pectínidos.

3. JUSTIFICACIÓN

En *Nodipecten subnodosus* ya ha sido demostrado que existe relación entre la disponibilidad de alimento y la reproducción, dada la movilización de reservas metabólicas desde el músculo aductor hacia la gónada. Ya ha sido reportado que bajo condiciones de baja disponibilidad de alimento el peso muscular disminuye durante la gametogénesis, mientras que en condiciones óptimas de alimento no se observa afectación sobre el peso y contenido de reservas energéticas en el músculo aductor (Racotta *et al.*, 2003; Arellano-Martínez *et al.*, 2004; Palacios *et al.*, 2005, 2007). Adicionalmente, se ha reportado que la productividad primaria del sitio de cultivo de *N. subnodosus* durante su crecimiento, también es un factor donde se va a ver involucrado el crecimiento del músculo aductor (Maldonado-Amparo *et al.*, 2004; Racotta *et al.*, 2008; Ramírez-Arce, 2009), demostrando que esta especie tiene una amplia capacidad adaptativa.

Hasta el momento un solo estudio ha sido realizado en relación a los genes que están involucrados en el crecimiento del músculo aductor. Un estudio de expresión génica en organismos de *Nodipecten subnodosus* demostró que la sobre-expresión del gen *miostatina* está relacionado con la pérdida muscular (atrofia) que es observada cuando los organismos están en condiciones ambientales subóptimas, en donde además se observaron alteraciones en las concentraciones de carbohidratos y lípidos (Morelos-Castro, 2011). Por lo tanto, si ya que se ha establecido que la miostatina es un regulador del crecimiento muscular por actuar como un inhibidor de la síntesis de proteínas (McFarlane *et al.*, 2006; Amirouche *et al.*, 2009), y que además se ha comprobado que es un regulador positivo de la glucólisis y consecuentemente un inductor de la lipogénesis (Chen *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2009) se puede inferir que este gen tiene una participación importante en el patrón de crecimiento que el músculo aductor de *N. subnodosus* presenta bajo diferentes condiciones ambientales (Maldonado-Amparo *et al.*, 2004; Ramírez-Arce, 2009).

El patrón de crecimiento del músculo aductor que *N. subnodosus* presenta en relación a las condiciones ambientales donde, bajo concentraciones sub-óptimas de alimento se observa una disminución del peso del músculo aductor mientras que, cuando las condiciones son favorables y existen condiciones óptimas de la alimento no se observa disminución aparente en el peso del músculo aductor, hace que esta especie sea un buen modelo para proveer información para el estudio de otras especies de pectínidos.

4. HIPÓTESIS

- Dado que el crecimiento del músculo aductor de *Nodipecten subnodosus* es modificado por las condiciones ambientales como la disponibilidad de alimento, van existir mecanismos génicos involucrados en el control del crecimiento que pueden ser identificados por medio de la expresión transcriptómica diferencial.
- En *Nodipecten subnodosus* el transcrito de la *miostatina* es altamente expresado en otros tejidos además del músculo aductor, podemos inferir que este gen desempeña otras funciones además de ser un regulador negativo del crecimiento.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el transcrito de la *miostatina* y evaluar el posible rol que desempeña en el control del crecimiento muscular bajo estrés nutricional en *Nodipecten subnodosus*

5.1. Objetivos Específicos

1. Aislamiento y caracterización del transcrito del gen de la *miostatina* en *Nodipecten subnodosus*.
2. Análisis de la expresión temporal de la *miostatina* en músculo aductor de *N. subnodosus* durante un ciclo anual de crecimiento en un sitio de baja productividad
3. Análisis de la expresión de la *miostatina* en *N. subnodosus* en organismos sometidos a estrés nutricional en diferentes estadios de crecimiento.
4. Evaluación del estado fisiológico del músculo aductor de *N. subnodosus* de los organismos sometidos a estrés nutricional por medio de la hibridación de un microarreglo heterólogo.
5. Análisis de la expresión temporal de la *miostatina* en diferentes tejidos de *N. subnodosus* además del músculo aductor durante un ciclo anual de crecimiento en un sitio de alta productividad.
6. Análisis de la expresión de las posibles variantes de la *miostatina* de *N. subnodosus* a lo largo de un ciclo anual de crecimiento en sitios de diferente productividad y bajo condiciones de estrés nutricional.

6. MATERIALES Y METODOS

Como fue mencionado en la introducción, Morelos-Castro (2011) observó una aparente sobre-expresión de la *miostatina* en otros tejidos además del músculo aductor, específicamente en glándula digestiva y gónada. Esto derivó en proponer la posible presencia de transcritos alternos de este gen en *N. subnodosus*, por lo que el presente trabajo inició con la identificación de estos posibles transcritos alternos de la *miostatina*. Posteriormente se continuó con el aislamiento completo del transcrito del gen de la miostatina, seguido de la caracterización de la secuencia y su análisis por PCR cuantitativo (qPCR) en diferentes etapas del crecimiento, así como en organismos bajo condiciones de estrés alimenticio (Fig.2).

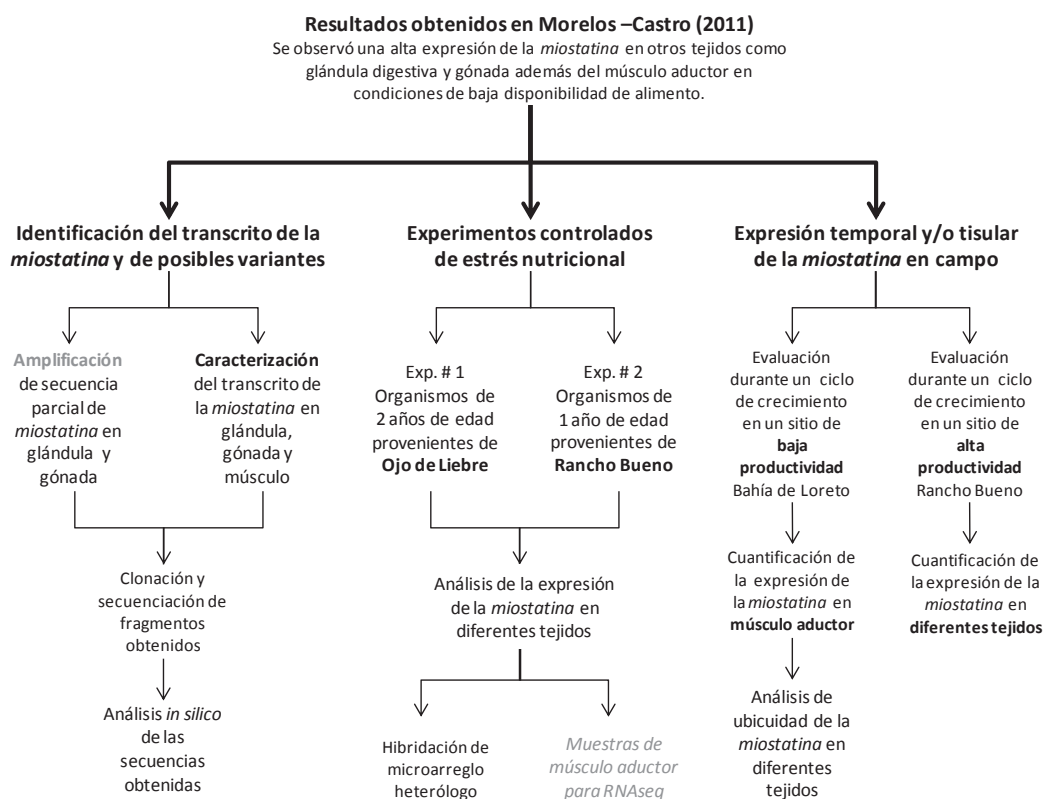


Figura 2. Esquema general del trabajo realizado durante el presente estudio.

6.1 RT-PCR (PCR de punto final) en músculo aductor, glándula digestiva y gónada para la evaluación de posibles productos de *splicing alternativo*

Ya que hasta el momento sólo se había obtenido una secuencia parcial de 562 pb de la *miostatina* en músculo aductor de *N. subnodosus*, fue necesario realizar amplificaciones de ADNc en otros tejidos como la glándula digestiva y gónada. Estos tejidos fueron seleccionados porque presentaron niveles de expresión de la *miostatina* más altos que el músculo aductor en un trabajo anterior (Morelos-Castro, 2011), mostrando resultados diferentes a lo que ya se había reportado en otros pectínidos, estableciendo la necesidad de verificar si efectivamente se estaba amplificando este gen.

6.1.1 Amplificación por PCR de punto final del ADN complementario (ADNc) de músculo aductor, glándula digestiva y gónada de Nodipecten subnodosus.

Utilizando los cebadores *MSTN-F* (forward) y *MSTN-R* (reverse) (Tabla I) diseñados y previamente utilizados por Morelos-Castro (2011) se amplificó ADNc de glándula digestiva y gónada de tres organismos diferentes, además del músculo aductor de dos organismos de *N. subnodosus* obtenidos de almeja mano de león evaluada para su crecimiento en Loreto Baja California Sur por Ramírez-Arce (2009). Estos cebadores amplifican un fragmento de 562 pb (Fig. 3). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador 2720 (Applied Biosystems) utilizando un volumen total de 6 µl, con 0.025 U de *Taq Platinum*, 1X de buffer para PCR, 0.21 µM de dNTP's, 2.5 mM de MgCl₂, 0.5 µM de cebador F y cebador R y 1 µl del ADNc de cada una de las muestras. Las condiciones de 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 al 1% con buffer TBE a una concentración de 1X, por 30 min a 100 voltios, con un marcador de tamaño de 50 a 10,000 pb *Direct Load Wide Range DNA Marker* (SIGMA, St Louis, MO). Para su

visualización en el fotodocumentador con UV (BioDoc-It Imaging System, UVP) se utilizó una tinción fluorescente con GelRed (Biotium, Hayward, CA).

6.1.2 Clonación de los fragmentos amplificados

Los fragmentos obtenidos (~400 pb en glándula digestiva y 562 pb músculo aductor y en gónada) fueron ligados a partir de la reacción de PCR y clonados utilizando el vector plasmídico *TOPO TA Cloning* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), transformados en bacterias competentes *E. coli TOP10* (Invitrogen) (ver Anexo I), y crecidas durante ~18 h en medio LB-Agar con ampicilina. De cada colonia levantada se realizó la amplificación por PCR utilizando los cebadores M13-F (forward) y M13-R (reverse) (Tabla I) en el termociclador Cyler 2720 (Applied Biosystems), utilizando las mismas concentraciones de amplificación mencionadas en la sección 6.1.1, a excepción de la concentración de 0.1 U de *Taq Platinum* y de los cebadores M13: 0.2 μ 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 al 1% para la verificación de los fragmentos obtenidos. Cada clona levantada previamente se guardó numerada en una placa de LB/Agar-Ampicilina, dejándolas crecer por aproximadamente 18 h. Las clonas seleccionadas de la amplificación por PCR con los cebadores M13 de acuerdo al tamaño del fragmento obtenido fueron nuevamente amplificadas bajo las mismas condiciones para incrementar la cantidad del producto. Todos los fragmentos obtenidos se enviaron a secuenciar en ambos sentidos (5'-3' y 3'-5') a MACROGEN (Corea).

Adicionalmente, para la discriminación de posibles artefactos en la RT-PCR durante la obtención del fragmento de ~400 pb en glándula digestiva, se realizó una amplificación en gradiente de cloruro de magnesio ($MgCl_2$). Para llevar esto a cabo, se realizó la extracción de ARN de glándula digestiva de cuatro organismos

muestreados en Bahía de Loreto BCS durante Ago-09, utilizando *TriPure Isolation Reagent* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) siguiendo el procedimiento recomendado por el proveedor, resuspendiendo en 15 µl de H₂O tratada con DEPC (Invitrogen). Se eliminó el ADN genómico presente en cada muestra utilizando *RQ1 DNase I* (Promega, Madison, WI) siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. El ADN complementario (ADNc) fue sintetizado a partir de 5 µg del ARN obtenido de cada organismo siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante de la enzima *Improm II Reverse Transcriptase* (Promega) y Oligo (dT)₁₅ (Promega). La amplificación con los cebadores *MSTN-F* y *MSTN-R* (Tabla I), se llevó a cabo en el termociclador 2720 (Applied Biosystems), utilizando las mismas concentraciones y condiciones de amplificación mencionadas antes en la sección 6.1.1, a excepción de las concentraciones de MgCl₂ que fueron de 1.5 mM, 2.0 mM, 2.5 mM y 3.0 mM. Los productos de la amplificación fueron separados, visualizados y documentados como se describió en la sección 6.1.1. Todos los fragmentos obtenidos se enviaron a secuenciar en ambos sentidos (5'-3' y 3'-5') a MACROGEN (Corea).

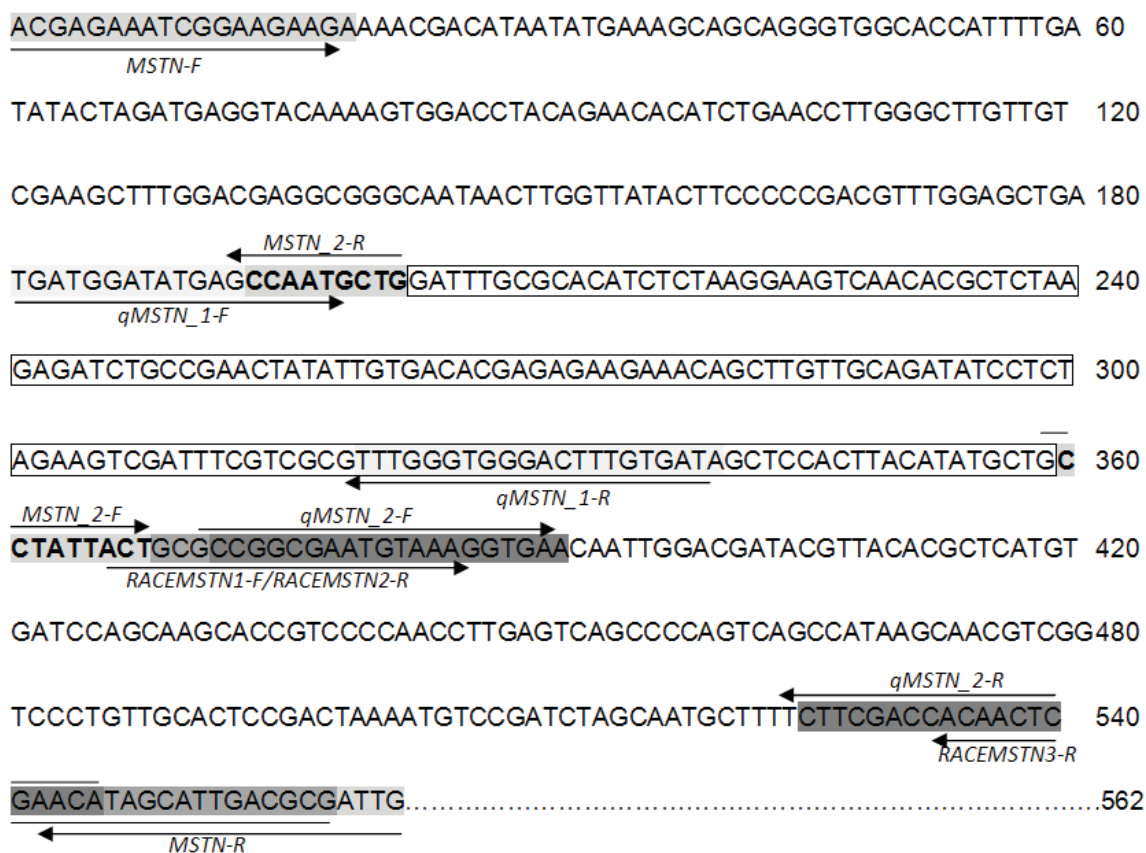


Figura 3. Localización de los cebadores: utilizados para el aislamiento y clonación de la secuencia parcial del gen de la *miostatina* en glándula digestiva, gónada y músculo aductor de *Nodipecten subnodosus*, los diseñados para la realización de la técnica RACE y los diseñados para la amplificación por PCR cuantitativo (qPCR) del transcrito de la *miostatina* en *Nodipecten subnodosus*. Los nucleótidos denotan la región que comprende la delección se encuentran marcadas con un cuadro.

Tabla I. Cebadores utilizados para el aislamiento y clonación de las secuencias parciales del gen de la *miostatina* en glándula digestiva, gónada y músculo aductor de *Nodipecten subnodosus*.

Gen	Secuencia de Cebador (5'-3')	Tm (°C)
<i>MSTN-F</i>	ACGAGAAATCGGMAGAAGA	56.3
<i>MSTN-R</i>	CAATCGCGTCAATGCTATGTT	64.7
<i>M13-F</i>	GTAAAACGACGACGGCCAG	57.6
<i>M13-R</i>	CAGGAAACAGCTATGAC	50.6
<i>RACEMST1-F</i>	CTGCGCCGGCGAATGTAAAG	71.6
<i>RACEMST2-R</i>	CTTTACATTCGCCGGCGCAG	59.5
<i>RACEMST3-R</i>	CGCGTCAATGCTATGTTCGAGTTG	71.2
<i>MSTN_2-F</i>	CCAATGCTGCCTATTACT	71.6
<i>MSTN_2-R</i>	AGTAATAGGCAGCATTGG	49.3
<i>qMSTN_1-F</i>	TGATGGATATGAGCCAATGC	63.5
<i>qMSTN_1-R</i>	ATCACAAAGTCCCACCCAAA	64.1
<i>qMSTN_2-F</i>	CGGCGAATGTAAAGGTGAAC	64.2
<i>qMSTN_2-R</i>	TGTTGAGTTGTGGTCAAG	63.9
<i>Nsub-Int2-1-F</i>	ACCGAAAATCGATGCTCTCA	54.2

6.2 Caracterización completa del transcrito de la *miostatina* por RACE (Random Amplification of cDNA Ends) individualmente en músculo aductor, glándula digestiva y gónada

Para poder caracterizar la secuencia completa del transcrito de la *miostatina* de *Nodipecten subnodosus* fue necesario realizar la técnica de RACE en los tres tejidos de la almeja hasta el momento de interés dados los resultados observados en Morelos-Castro (2011) y los fragmentos de diferente tamaño obtenidos como ya se mencionó anteriormente. Para lo cual se realizó la siguiente metodología:

6.2.1 Extracción de ARN y purificación de poly (A+)

Para el RACE de músculo aductor se realizó la extracción de ARN total y purificación de poly(A+) utilizando tejido de 15 individuos de *N. subnodosus*. Los individuos utilizados fueron seleccionados de diferentes experimentos y condiciones experimentales con fines de potenciar la obtención de todos los

transcritos o formas de este gen: 10 fueron de origen silvestre de Laguna Ojo de Liebre, y cinco de organismos en cultivo en Bahía de Loreto BCS. Para el RACE de glándula digestiva se utilizaron ocho organismos silvestres de origen Ojo de Liebre. La extracción se realizó utilizando *TriPure Isolation Reagent* (Roche Applied Science) siguiendo el procedimiento del proveedor con modificaciones realizadas por de las Heras-Saldaña (2012) (Anexo II). El ARN se resuspendió en volúmenes de entre 20 y 50 μl de H_2O 0.1% DEPC (Invitrogen). Se cuantificó la concentración del ARN obtenido de cada individuo utilizando un espectrofluorómetro (Thermo Scientific NanoDrop 1000). Se verificó su integridad por medio de electroforesis horizontal de 2 μl de ARN obtenido de cada tejido en un gel de agarosa al 1% con buffer TAE a una concentración de 1X, por 60 min a 60 voltios (Fig. 4 y 5). Para su visualización en el fotodocumentador-UV se utilizó una tinción fluorescente con *GelRed*. Del ARN obtenido para cada tejido se conformaron *pools* (~241 μg en ~530 μl de ARN de músculo aductor y ~768 μg en ~700 μl de ARN de glándula digestiva) para la purificación del ARN mensajero utilizando el kit Poly(A) Purist Kit (Ambion, Inc. Austin, TX) siguiendo las instrucciones del proveedor (Anexo III).

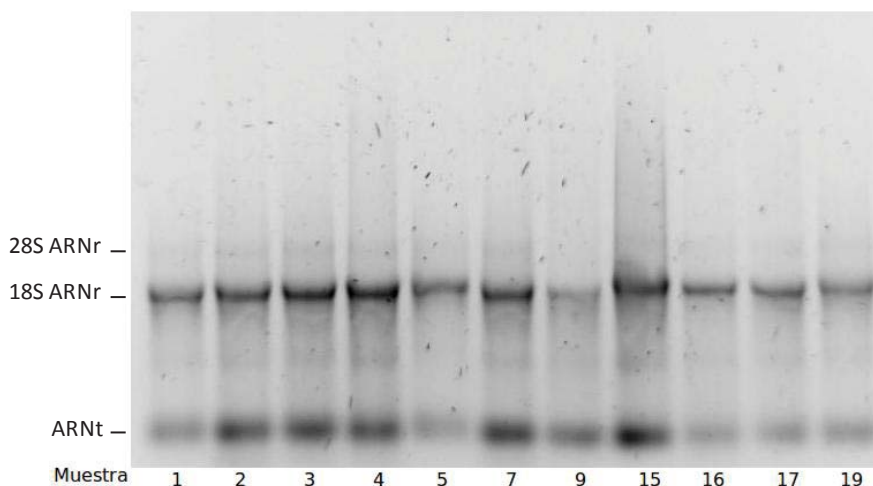


Figura 4. Electroforesis de ARN de músculo aductor de 11 individuos utilizados para la purificación de ARN mensajero (poly A)

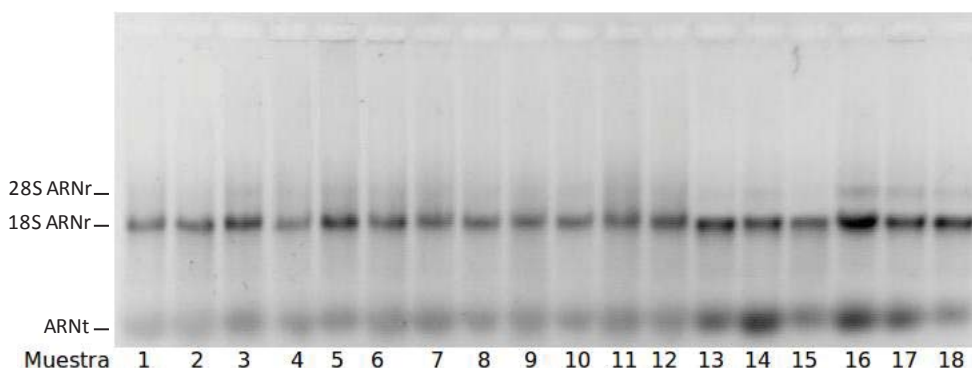


Figura 5. Electroforesis de ARN de glándula digestiva de 18 muestras utilizados para la purificación de ARN mensajero (poly A).

6.2.2 Síntesis de ADNc (ADN complementario) por RACE

A partir del pool de ARN mensajero (poly A+) obtenido de cada tejido, se sintetizó ADNc utilizando el sistema *SMARTer RACE cDNA Amplification kit* (Clontech, Mountain View, CA). El ADNc RACE en dirección 5' para ambos tejidos se sintetizó siguiendo las instrucciones del proveedor, así como el ADNc en dirección 3' de músculo aductor. Para el ADNc RACE en dirección 3' de glándula digestiva se utilizaron 1 U de la enzima *Improm II Reverse Transcriptase* (Promega), 1X de *Improm II 5X Reaction Buffer* (Promega) y 2mM de $MgCl_2$ (Promega). El ADNc obtenido se diluyó en 250 μ l de Tricine-EDTA (Clontech), haciéndose alícuotas de 25 μ l que fueron preservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2.3 Amplificación por PCR punto final

Para el aislamiento de transcritos de la *miostatina*, la amplificación del ADNc obtenido por RACE se realizó utilizando diferentes juegos de cebadores. *RACEMST1-F*, *RACEMST2-R* y *RACEMST3-R* (Tabla I; Fig. 3) fueron diseñados a partir de una secuencia parcial de 244 pb de la *miostatina* de *Nodipecten subnodosus*, obtenida con los cebadores utilizados por Morelos-Castro (2011) en los análisis de expresión (qPCR) de la *miostatina*. El resto de los cebadores

utilizados para la obtención de transcritos por RACE son *MSTN-F*, *MSTN_2-F* y *MSTN_2-R* que fueron diseñados en otra parte del presente trabajo.

Adicionalmente al ADNc-RACE en dirección 5' y 3' de músculo aductor y glándula digestiva, se utilizó ADNc RACE de gónada en ambas direcciones sintetizado previamente a partir de organismos en estadio activo e inactivo de madurez gonadal, que fueron producidos en el laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola del CIBNOR y crecidos en Rancho Bueno, Baja California Sur.

La amplificación ADNc obtenido en ambas direcciones de los cebadores *RACEMST1-F* (dirección 3') y *RACEMST3-R* (dirección 5') se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor, utilizando 1X de *50X Advantage Polymerase Mix* (Clontech), de *10X Advantage 2 PCR Buffer* (Clontech), *0.2 mM de 50X dNTP Mix* (Clontech), 1X de *10X Universal Primer Mix (UPM)*, Clontech), 0.2 µM de cada primer específico y 1.25 µl de ADNc-RACE de músculo aductor y 5 µl de glándula digestiva y de gónada. Las condiciones para la amplificación fueron de 5 ciclos, cada uno de 30 s a 94°C y 3 min a 72°C, 5 ciclos cada uno de 30 s 94°C, 30 s a 70°C y 3 min 30 s a 72°C (desnaturalización / alineación / extensión) y 20 ciclos, cada uno de 30 s a 94°C, 30s a 68°C y 3 min 30 s a 72°C (desnaturalización / alineación / extensión). La verificación de las amplificaciones se realizó por medio de electroforesis horizontal en un gel de agarosa visualizado en el fotodocumentador- UV por medio de una tinción fluorescente con *GelRed*.

De los fragmentos obtenidos de la amplificación en dirección 5' y 3' se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% con TBE 1X con una tinción fluorescente de *SyBr Green* (Invitrogen) para ser visualizados en un transiluminador (Dark Reader, Clearchemical) donde se cortaron del gel. Los fragmentos obtenidos fueron purificados con el sistema *Ultra Clean 15 DNA Purification kit* (MoBio, Laboratories, Inc., Carlsbad, CA) y con *Pure Link Quick Gel Extraction kit* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los fragmentos fueron verificados en un gel de agarosa al 1% teñido con *Gel Red* con las condiciones antes mencionadas y reamplificados a partir de diluciones (1:10

para los fragmentos 5' de músculo aductor, 1:50 para los fragmentos de 3' de músculo aductor y 1:30 para los fragmentos de 3' de glándula digestiva). La reacción de reamplificación se realizó utilizando un volumen total de 11 µl conteniendo 2 U de *Taq Polimerasa Recombinante* (Invitrogen), 1

(Invitrogen), 0.48 µM del cebador *RACEMSTN1-F* para la dirección 3' y del cebador *RACEMSTN3-R* para la dirección 5', y 0.5x de *10X Universal Primer Mix* (Clontech) con 1 µl de la dilución de cada una de los fragmentos purificados. Las condiciones para la amplificación fueron de 3 min a 94°C, 1 min a 80°C (en el cual se agregó las 2 U de *Taq Polimerasa*) seguido de 20 ciclos, cada uno de 30 s a 94°C, 30s a 60°C y 3 min 30 s a 72°C (desnaturalización / alineación / extensión), con una extensión final de 25 min a 72°C. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis horizontal en un gel al 1% en TBE 1X (100 volts por 30 min), teñido con *GelRed*, utilizando un marcador de tamaño de 50 pb a 10 kb *DirectLoad Wide Range DNA Marker* (SIGMA) junto con los productos de PCR para identificar el fragmento por su tamaño. Estos fueron visualizados en un foto-documentador UV.

El segundo juego de cebadores utilizados en la amplificación del ADNc por RACE para el aislamiento de los transcritos de la *miostatina* fueron *MSTN_2-F* y *MSTN_2-R* (Tabla I; Fig. 3). La amplificación se realizó utilizando 0.5 U de *Taq Polimerasa Recombinante* (Invitrogen), 1X de buffer para PCR, 0.20 mM de dNTP's (Invitrogen), 2.5 mM de MgCl₂, 0.5X de *10X Universal Primer Mix* (Clontech) y 0.2 µM de cada primer específico utilizado (*MSTN_2-F* se utilizó para amplificar en la dirección 3' y el *MSTN_2-R* para la dirección 5'). Las condiciones para la amplificación fueron 4 min a 94°C, 30 ciclos cada uno de 30 s a 94°C, 30s a 62°C y 3 min 30 s a 72°C (desnaturalización / alineación / extensión), con una extensión final de 25 min a 72°C. La verificación de las amplificaciones se realizó por medio de electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% como se ha indicado antes.

Se realizó una nueva amplificación del ADNc obtenido por RACE con glándula digestiva utilizando el cebador, *RACEMSTN2-R* para la amplificación 5' (Tabla I; Fig. 3) y para la amplificación en la dirección 3' se utilizó un cebador originalmente diseñado y utilizado en el PCR de punto final, el *MSTN-F* (Tabla I) cada uno en conjunto con el primer *10X Universal Primer Mix* del *SMARTer RACE cDNA Amplification kit* (Clontech) para la obtención completa del transcrito. La amplificación del ADNc obtenido en ambas direcciones se realizó utilizando las condiciones utilizadas con los cebadores *RACEMST1-F* y *RACEMST3-R*. Las condiciones para la amplificación en dirección 3' fueron de 4 min a 94°C, seguido de 20 ciclos cada uno de 30 s a 94°C, 30 s a 62°C y 3 m 30 s a 72°C (desnaturalización / alineación / extensión) con una extensión final de 25 min a 72°C. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis horizontal y observados como se describió anteriormente.

6.2.4 Clonación y secuenciación

Los fragmentos obtenidos de la primera amplificación en dirección 5' de glándula digestiva y gónada fueron ligados directamente de la amplificación, así como la segunda amplificación en dirección 5' de músculo aductor. Los fragmentos restantes fueron ligados a partir de una dilución 1:10 de la reamplificación de cada fragmento purificado. Los fragmentos mayores a 2000 pb fueron clonados con el vector *TOPO XL Vector* (Invitrogen) y el resto con el vector *p-GEM-T Vector* y *p-GEM-T Easy Vector* (Promega) en una reacción de la mitad del volumen de la recomendada por el proveedor, las cuales se dejaron a -20°C y a 4°C respectivamente durante toda la noche. Aproximadamente 16 h después, se realizó la transformación en células quimio-competentes *OneShot[®] TOP10* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las bacterias transformadas fueron crecidas durante ~18 h en medio LB/Agar con kanamicina para la ligación con *Topo XL Vector* y con ampicilina para las ligaciones con *p-GEM-T Vector* y *p-GEM-T Easy Vector* a 37°C durante ~18 h. Se levantaron entre

5 y 7 colonias de la clonación de cada fragmento y se crecieron en medio LB con ampicilina o kanamicina, incubados a 37°C durante ~16 h. Se realizó la purificación del plásmido por medio de lisis alcalina, verificando la presencia del inserto linearizando el plásmido usando una digestión enzimática con *ECO RI* (PROMEGA) para las ligaciones con *Topo XL Vector* y *p-GEM-T Easy Vector*, en una reacción de 12 µl de volumen final utilizando 1 U de enzima *ECO RI*, 10 U de BSA, 0.83X de buffer H y 2 µl del plásmido purificado. Se realizó una electroforesis horizontal con 5 µl de cada plásmido linearizado en un gel de agarosa al 1% y visualizado como se describió en la sección 6.1.1. Los insertos con *p-GEM-T Vector* fueron verificados por medio de una amplificación por PCR usando los cebadores *M13-F* y *R* como se indica en la sección 6.1.2, y verificados por medio de electroforesis horizontal como ya ha sido descrito. Las clonas en las que fue verificado el inserto del fragmento clonado fueron enviados a secuenciar a Macrogen (Corea).

6.2.5 Análisis in silico de las secuencias obtenidas por RACE

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 de aminoácidos (*Blastp*) 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/>. Se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias proteicas con ClustalW <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>. El *ORF* (*Open Reading Frame*) fue identificado usando el programa en línea *ORF Finder* en el sitio de internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>. El péptido señal y el sitio de escisión de la furina o en general sitios de escisión de PC (proprotein convertasa) fueron

identificados utilizando el servidor ProP 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>; Duckert *et al.*, 2004). La verificación de una caja TATA en la secuencia fue hecha utilizando el programa HCtata software en el sitio WebGene (http://bioinfo4.itb.cnr.it/~webgene/wwwHC_tata.html). Se llevó a cabo un análisis *in silico* de las UTRs de la secuencia de la *Ns-mstn* usando UTRscan (<http://itbtools.ba.itb.cnr.it/utrscan>) para la identificación de elementos regulatorios presentes e involucrados en la regulación de la traducción, la estabilización del ARN (*UNRbs: UNR binding site*), o en la regulación post-transcripcional (*K-boxes*) (Lai *et al.*, '98; Chang *et al.*, 2004; MacNicol *et al.*, 2011). Adicionalmente se realizó un alineamiento de las UTR 3' de *Argopecten irradians* (Acceso Genbank: JN684903.1), *A. purpuratus* (Acceso Genbank: KC771285.1), *A. ventricosus* (datos sin publicar) y *Azumapecten farreri* (Acceso Genbank: EU563852.2) para la identificación de secuencias *K-box* en las mismas.

6.2.6 Diseño de cebadores específicos para la amplificación de la miostatina en *Nodipecten subnodosus* para el análisis de expresión en el presente estudio

Se diseñaron cebadores específicos para la amplificación del transcrito de la *miostatina*. Los cebadores *qMSTN_1-F* y *qMSTN_1-R* fueron diseñados para amplificar (159 pb) una parte de la secuencia donde se localizó la 'delección' observada del transcrito del gen de la *miostatina*: el cebador Forward (*qMSTN_1-F*) cae fuera y hacia arriba de la 'delección' en la secuencia mientras que el cebador Reverse (*qMSTN_1-R*) cae dentro de la misma (Tabla I; Fig. 3), de tal forma que los transcritos cuantificados sólo incluyan aquellos que no presentan la delección. Adicionalmente, se evaluó la expresión de transcritos de la *miostatina* que presenten o no la delección utilizando el cebador *qMSTN_2-F* y *qMSTN_1-R* (Tabla I) que amplifican un fragmento de 170 pb que corresponde a una parte de la secuencia hacia abajo de la delección (Fig. 3), encontrándose en la parte de la secuencia que codifica para el extremo C-terminal, la parte más conservada de la proteína. Estos segundos cebadores fueron los previamente diseñados y utilizados por Morelos-Castro (2011).

6.2.7 Extracción de ADN genómico y amplificación del Intrón II del gen de la miostatina en *Nodipecten subnodosus*

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de tejido muscular de *N. subnodosus* utilizando el protocolo para abulón modificado de Sweijd *et al.* (1998) (ver Anexo IV). Se realizó la amplificación usando el ADN genómico obtenido de cuatro individuos y los cebadores *MSTN-F* (Tabla I), el cual se encuentra ubicado en el 2^{do} exón y *qMSTN_1-R* (Tabla I) ubicado en el 3^{er} exón. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador C1000 (Bio-Rad) utilizando un volumen de 6 μ l, conteniendo 0.5 U de *Go-Taq Flexi Polymerasa* (Promega), 1X de *Colorless GoTaq Reaction Buffer* (Promega), 3 mM de $MgCl_2$, 0.3 mM de dNTP's (Promega), 0.5 μ M de cebador F y cebador R y 1 μ l de ADN genómico. Las condiciones para la amplificación fueron de 5 min a 94° C seguido de 30 ciclos, cada uno de 30 s a 94° C, 30 s a 56° C y 3 min a 72° C (desnaturalización / alineación / extensión), con una extensión final de 30 min a 72° C. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE a una concentración de 1X, por 30 min a 100 voltios, con un marcador de tamaño de 50 a 10,000 pb *Direct Load Wide Range DNA Marker* (SIGMA). Para su visualización en el fotodocumentador - UV se utilizó una tinción fluorescente con *GelRed*. De esta amplificación se seleccionó el fragmento más grande (> 2000 pb) que presumiblemente contendría el Intrón II del gen de la *miostatina* de *N. subnodosus*. El fragmento se cortó, purificó y clonó con el vector *p-GEM-T Easy Vector* (Promega) en una reacción de la mitad del volumen de la recomendada por el proveedor, se dejaron a 4°C toda la noche y se realizó la transformación con bacterias quimiocompetentes JM-109 (Promega) (ver anexo I). Se realizó la lisis alcalina (ver anexo V), se obtuvo el ADN plasmídico y se realizó la amplificación de la clona seleccionada con los cebadores *M13 F* y *R* (Tabla I), con las condiciones de amplificación mencionadas en la sección 6.1.2. El fragmento obtenido se envió a secuenciar a MACROGEN (Corea). La secuenciación se realizó en ambos sentidos (5'-3' y 3'-5').

Debido a que el fragmento a secuenciar era mayor a 2000 pb, las secuencias obtenidas en ambos sentidos no fueron suficientes para que estas se empalmaran, por lo que se diseñó un cebador 'interno' *Nsub-Int2-1-F* (Tabla I) para obtener una secuencia interna y así una secuencia consenso con la secuencia parcial antes obtenida. La amplificación se realizó con el cebador *qMSTN_1-R* (Tabla I), con las mismas condiciones de amplificación mencionadas en esta sección. Los fragmentos obtenidos fueron clonados y enviados a secuenciar como ya se mencionó.

6.2.8 Identificación de posibles sitios alternativos de *splicing*

Una vez obtenida la secuencia del Intrón II del gen de la *miostatina* de *N. subnodosus*, se realizó la secuencia consenso con la secuencia completa del transcrito obtenida por RACE del músculo aductor y ésta fue utilizada para realizar el análisis de sitios de *splicing* alternativo con el programa en línea ASSP (<http://wangcomputing.com/assp/>; Wang y Marín, 2006) con la finalidad de encontrar sitios de *splicing* que pudieran explicar deleción observada anteriormente.

6.3 Modelación *in silico* de la proteína de la miostatina de *Nodipecten subnodosus*

Para conocer si la proteína de la MSTN en *N. subnodosus* presenta las características de todos los miembros de los TGF- β , se realizó la modelación de la proteína de la *miostatina* de *Nodipecten subnodosus* por homología, utilizando el servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>; Arnold *et al.*, 2005), generando modelos tridimensionales de la parte activa de la proteína MSTN de *Nodipecten subnodosus*, GDF-8 de *Homo sapiens*, y Mioglianina de *Drosophila melanogaster*. Para visualizar la estructura de los modelos se utilizó el software Deep View Swiss-PDB Viewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>).

6.4 Análisis filogenéticos y alineamiento con proteínas homólogas/ortólogas de la miostatina de *Nodipecten subnodosus* y miembros de la superfamilia de TGF- β

Con la finalidad de establecer la relación de la MSTN de *N. subnodosus* con sus ortólogos descritos en otros invertebrados, así como con otros miembros de la superfamilia de los TGF- β , fue necesario realizar un análisis filogenético que permitiera establecer esta relación con base en la similitud de la secuencia del péptido conservado de cada una de las proteínas.

*6.4.1 Análisis filogenético de la miostatina de *N. subnodosus* y miembros de la superfamilia de TGF- β*

Se realizó un análisis filogenético usando el programa MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis; Tamura *et al.*, 2013). Se utilizó la secuencia de la *miostatina* de *Nodipecten subnodosus* y las secuencias de otras proteínas miembros de la superfamilia de TGF- β (DPP, GBB, GDF2, MAVERICK, BMP-2/7 e INHIBINA) de invertebrados, para la construcción del árbol filogenético. Estas secuencias fueron seleccionadas en una búsqueda de proteínas homólogas/ortólogas a la MSTN en *Nodipecten subnodosus*, realizada en la herramienta en línea BLASTP de NCBI (ver sección 6.2.5). Un total de 37 secuencias de miembros de la superfamilia de TGF- β fueron alineados usando MUSCLE (Edgar, 2004) con la configuración predeterminada y por medio del programa Gblocks (Talavera y Castresana, 2007), se excluyeron los segmentos que tenían posiciones variables o gaps, eligiendo sólo los bloques conservados del alineamiento múltiple. Se utilizó la proteína GDNF (por sus siglas en inglés *Glial-Derived Nerve Growth Factor*) del ratón *Mus musculus* como grupo externo (Kahlem y Newfeld, 2009; Kenny *et al.*, 2014). Se seleccionó el mejor modelo con base en el Criterio de Información Bayesiano (*BIC* por sus siglas en inglés) utilizando el programa MEGA 6.0, con los segmentos conservados obtenidos de Gblocks de aproximadamente 59 aminoácidos y se realizó el árbol filogenético. Los datos fueron analizados usando un modelo WAG para corrección de las

distancias y los espacios (*gaps*) fueron removidos por delección completa. La estabilidad topológica del árbol fue evaluada por 10,000 *bootstraps*.

6.4.2 Alineamiento de proteínas homologas/ortólogas de la miostatina de *Nodipecten subnodosus*

Se realizó un alineamiento múltiple con Uniprot (<http://www.uniprot.org/align/>) de las secuencias de las proteínas de MIOSTATINA/GDF-11 de moluscos y crustáceos, y de la proteína MIOGLIANINA de *Drosophila spp.*, las cuales se encuentran agrupadas en el mismo clado en el árbol filogenético y fueron alineadas en el mismo orden. Se utilizaron los últimos 129-143 aminoácidos de cada secuencia ya que representa la parte de la proteína que está más conservada entre las especies. Adicionalmente, se realizó la identificación del sitio de procesamiento proteolítico (furina/proteína convertasa (PC)) de cada una de las secuencias de MIOSTATINA/GDF-11 y de la MIOGLIANINA, con el programa en línea ProP 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>; Duckert *et al.*, 2004).

6.5 Cuantificación por PCR en tiempo real (qPCR) de la expresión del transcrito de la *miostatina* en músculo aductor de *Nodipecten subnodosus* durante un ciclo anual de crecimiento en un sitio de baja productividad y determinación de su ubicuidad

Para poder conocer si la miostatina de *Nodipecten subnodosus* está involucrada con el crecimiento muscular de la almeja, se realizó el análisis de expresión durante un ciclo de crecimiento para poder relacionar el incremento del peso de la biomasa/músculo aductor de estos organismos, con la expresión de este gen. Adicionalmente, fue necesario realizar nuevamente el análisis de expresión de la miostatina en diferentes tejidos de la almeja para validar los resultados obtenidos anteriormente en el mes de agosto del 2009 obtenidos en Morelos-Castro (2011).

6.5.1 Obtención de material biológico

El material biológico utilizado para la realización de este objetivo es el mismo utilizado en Morelos-Castro (2011), el cual debió ser reanalizado debido a que en ese trabajo no se realizó una validación de genes de referencia acorde a las nuevas recomendaciones (Bustin *et al.*, 2009) para realizar análisis de expresión génica. Los organismos de almeja *Nodipecten subnodosus* utilizados en el cumplimiento de este objetivo derivan de los producidos y reportados por Ramírez-Arce (2009), que fueron mantenidos durante 476 días (Abril-2008 a Agosto-2009) en suspensión durante la engorda. En este periodo, el crecimiento fue evaluado a intervalos de 45 a 60 días, en donde se realizaron biometrías para evaluar variables de crecimiento tal como el peso del músculo aductor y la biomasa. En paralelo a los muestreos de Ramírez-Arce (2009) se realizaron muestreos de tejido muscular de organismos al azar en Jul-08 (84 días de cultivo), Sep-08 (137 días de cultivo), Dic-08 (231 días de cultivo), Feb-09 (282 días de cultivo), Abr-09 (351 días de cultivo), Jun-09 (406 días de cultivo) y Ago-09 (476 días de cultivo). En cada muestreo se tomó una porción de ~200 mg de cada uno de los 15 organismos muestreados. Adicionalmente en el mes de Ago-2009, se tomaron muestras de manto, glándula digestiva, branquia y gónada que al igual que el músculo aductor fueron preservados en solución acuosa de sal sulfato (Nolan y Bustin, 2008) (Anexo VI), almacenadas a 4 °C por aproximadamente 18 h y después se almacenaron a -20 °C hasta su uso. La temperatura fue obtenida con un termógrafo mantenido *in situ* y la clorofila fue estimada por imágenes de satélite de acuerdo a los datos obtenidos con SeaWiFS (Sea-viewing Wide Field of view Sensor) y MODIS-Aqua (Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer).

6.5.2 Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc)

Se realizó la extracción individual de ARN total de músculo aductor de cada uno de los 15 individuos muestreados durante el ciclo anual ya mencionado y de manto, branquia, gónada, glándula digestiva y nuevamente de músculo aductor de cinco organismos muestreados en el mes de Ago-2009. La extracción se realizó utilizando *TriPure Isolation Reagent* (Roche Applied Science) siguiendo el procedimiento del proveedor con modificaciones realizadas por De las Heras-Saldaña (2012) (Anexo II). El ARN se resuspendió en volúmenes de entre 20 a 30 μ l de H₂O 0.1% DEPC (Invitrogen). Se precipitó el ARN utilizando el protocolo de Sambrook (2001) agregando 0.5 volúmenes de LiCl 4M, lavando el ARN con la adición de 500 μ l de etanol al 75% dos veces. El ARN obtenido se resuspendió en 20 μ l de H₂O 0.1% DEPC. Del volumen total de ARN obtenido se eliminó el ADN genómico utilizando 5 U de *RQ1 DNase I* (Promega), 1X de Buffer, y 0.5 U de *RNAsin* (Promega) y H₂O tratada con DEPC en un volumen final de 20 μ l. Se incubaron a 37 °C por 60 min, deteniendo la reacción con 1 μ l *Stop Solution* (Promega) e incubando a 65 °C por 10 min. Una vez eliminado el ADN genómico, 1 μ l de cada una de las muestras fue utilizado para amplificar por PCR de punto final el gen de referencia *act- β* (β -Actina) para verificar que se haya eliminado por completo el ADN genómico. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando un volumen de reacción de 6 μ l conteniendo además de 1 μ l de ARN, 0.25 U de *GoTaq Flexi Polymerasa* (Promega), 1x de *Colorless GoTaq Flexi Buffer* (Promega), 2.0 mM de MgCl₂ (Promega), 0.2 mM de dNTP mix (Promega) y H₂O Milli Q. 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. La no-amplificación de productos fue analizada por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE a una concentración de 1X, por 30 min a 100 voltios, con un marcador de tamaño de 50 a 10,000 pb *Direct Load Wide Range DNA Marker* (SIGMA). Para su visualización en el fotodocumentador - UV se utilizó una tinción fluorescente con *GelRed*.

Se cuantificó la concentración del ARN obtenido de cada individuo utilizando el espectrofluorómetro NanoDrop 1000. Se verificó su integridad por medio de electroforesis horizontal de 2 µl de ARN obtenido de cada tejido en un gel de agarosa al 1% con buffer TAE a una concentración de 1X, por 60 min a 60 voltios. Una vez verificada cada muestra se utilizó 1 µg de cada ARN total para la síntesis del ADN complementario (ADNc) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante de la enzima *Improm II Reverse Transcriptase* (Promega) y Oligo (dT)₁₈ (Sigma-Aldrich) y cada muestra de ADNc fue cuantificada con el espectrofluorómetro Nanodrop. Una vez sintetizado el ADNc, 1 µl de cada una de las muestras fue utilizado para amplificar por PCR de punto final el gen de referencia *act-β* (β -Actina) para verificar que se haya llevado a cabo la síntesis de ADNc. La reacción de PCR y la visualización de los productos se llevó a cabo como se mencionó anteriormente para la verificación de la eliminación del ADN genómico. De las muestras de músculo aductor de los siete meses de muestreo (Jul-08 a Ago-09) se realizaron *pooles* de 5 organismos en concentraciones equivalentes, resultando en tres *pooles* por cada uno de los meses de muestreo y un total de 21 *pooles* de ADNc de músculo aductor para su análisis. Las muestras de cinco individuos de manto, branquia, gónada, glándula digestiva y músculo aductor del mes de Ago-09 se analizaron individualmente.

6.5.3 Evaluación de la estabilidad de los genes de referencia para la normalización de la expresión del gen de la miostatina

Los genes de referencia utilizados para la normalización de la expresión de los transcritos de la *miostatina* en músculo aductor durante el ciclo anual de crecimiento y los siguientes análisis de expresión en el presente trabajo son los reportados por Llera-Herrera *et al.* (2012b) para análisis en gónada de *N. subnodosus*: *rpl8* (riboproteína 18), *tub-α* (alfa-tubulina), *ef-1α* (factor de elongación 1α), *act-β* (beta-Actina) y 18S (18S-ARNr) (Tabla II). El uso de un gen de ARN ribosomal como 18S ha sido recientemente demostrado por Llera-Herrera *et al.*

(2012b) como adecuado en *N. subnodosus*, ya que el ADNc que se ha sintetizado con oligo-dT, resulta en pequeñas cantidades de ADNc a diferencia de cuando es sintetizado con *random primers*. El gen *tub- α* sólo fue evaluado para utilizarlo en el análisis del ciclo anual de músculo aductor ya que, este gen ha sido reportado como un gen específico de músculo y de testículo (Llera-Herrera *et al.*, 2012b). Las amplificaciones se realizaron por triplicado en un termociclador de tiempo real CFX96 (Bio-Rad), utilizando placas de 96 pozos y films adhesivos ópticos (Bio-Rad). Se determinó la eficiencia de amplificación para cada uno de los genes antes mencionados a partir de un *pool* de concentraciones equivalentes (1 μ g) del ADNc. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 15 μ l que fueron preparadas utilizando 7.5 μ l de una mezcla 'casera' para qPCR descrito en Llera-Herrera *et al.* (2012) que contiene: 1x *EvaGreen* (Biotium, Hayward, CA), 0.45 U de *Go-Taq Flexi Polymerasa* (Promega), 1x de *Colorless GoTaq Flexi Buffer* (Promega), 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP mix (Promega) y H₂O grado biología molecular (Sigma); 5 μ l de la dilución de ADNc 1:50 y para cada par de cebadores de los genes de referencia a evaluar se utilizaron diferentes concentraciones con base en las curvas de eficiencia: 0.25 mM para *rpl8*, 0.16 mM para *tub- α* ; 0.16 mM para *ef-1 α* ; 0.13 mM para *act- β* y 0.46 mM para *18S*. Las condiciones de amplificación fueron: 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C donde se llevó a cabo la lectura de la fluorescencia (desnaturalización/alineación-extensión). La curva de desnaturalización fue de 60 °C a 95 °C con un incremento de 0.5 °C / seg. Cada curva de disociación obtenida (*melting curve*) fue analizada mediante la temperatura de fusión para la confirmación de un solo amplicon para cada gen y la discriminación de posibles productos inespecíficos o dímeros, ya que la temperatura de fusión de los productos específicos se disocian a una temperatura más alta que los artefactos de la PCR (Ririe *et al.*, 1997). Se determinó la eficiencia de amplificación (E) para cada uno de los genes antes mencionados, calculando la pendiente de diluciones seriadas (1:5) de un *pool* de concentraciones equivalentes de los 21 *pooles* de ADNc obtenidos de músculo aductor y de un *pool* de ADNc de los cinco tejidos

obtenidos en agosto-09. Los valores de eficiencia (E) fueron obtenidos de la pendiente del logaritmo del factor de dilución contra la fluorescencia, usando la ecuación $E = (10^{(-1/\text{slope})} - 1)$ (Bustin *et al.*, 2009). Una vez determinada la eficiencia de cada gen de referencia candidato, se llevó a cabo la evaluación de la estabilidad de su expresión, la cual se realizó a partir de una dilución de 1:50 del ADNc de cada *pool* de músculo de los meses a evaluar (Jul-08 a Ago-09) por triplicado. La PCR en tiempo real se llevó a cabo utilizando las mismas condiciones de amplificación ya mencionada en las curvas de eficiencia en esta misma sección. Los Cq obtenidos de cada réplica se promediaron y fueron utilizados para calcular (análisis preliminares) la estabilidad en la expresión de cada gen de referencia en la página de internet de *EST Database Cotton* (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>), con base en los algoritmos utilizados por los programas *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002), *NormFinder* (Andersen *et al.*, 2004), *Bestkeeper* (Pfaffl *et al.*, 2004) y el método de Cq Comparativo (Silver *et al.*, 2006).

6.5.4 Análisis de la expresión relativa de la miostatina en músculo aductor de Nodipecten subnodosus en un ciclo de crecimiento en un sitio de baja productividad

La amplificación por qPCR de la *miostatina* de *Nodipecten subnodosus* para el análisis de su expresión en un ciclo de crecimiento, se llevó a cabo con ambos pares de cebadores (*qMSTN_1-F/qMSTN_1-R* y *qMSTN_2-F/qMSTN_1-R*, Tabla I). La concentración de los cebadores *qMSTN-F/qMSTN-R* y *qMSTN_2-F/qMSTN_2-R*, utilizada en cada reacción de qPCR fue de 0.3 μM . La amplificación por qPCR se realizó como se menciona en la sección 6.5.3 para los genes de referencia. Se determinó la eficiencia de amplificación (E) de estos cebadores como se indica en la sección 6.5.3 para los genes de referencia. La eficiencia se utilizó para la corrección de la eficiencia gen-específica en el modelo de cuantificación relativa recomendado por Pfaffl (2004). Las cantidades relativas

(CR) para los genes de referencia seleccionados por su estabilidad para cada análisis y el gen de la *miostatina* (gen blanco), fueron estimadas con la ecuación $CR = (1+E)^{(Cq_{promedio} - Cq)}$ donde CR= cantidad relativa. Los valores de expresión relativa (ER) de la *miostatina* fueron calculados como la proporción de las cantidades relativas (CR) de cada muestra con la ecuación $ER = CR_t/CR_{nf}$ (t=target gene (gen blanco = *miostatina*), y nf=factor de normalización= media geométrica de los genes de referencia) (Hellemans *et al.*, 2007).

6.5.5 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de éste y los siguientes análisis de expresión de la *miostatina* en *N. subnodosus* en el presente trabajo fueron realizados usando STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc.). Los datos de crecimiento fueron analizados estimando los incrementos absolutos entre periodos de muestreo por biomasa o peso húmedo (de mayo del 2008 a agosto del 2009), y el peso del músculo aductor (de julio del 2008 a agosto del 2009). Las medias de cada una de las tres réplicas fueron usadas en el análisis de varianza (ANDEVA) seguida de una prueba exacta de Tukey. Las diferencias en la expresión relativa de la *miostatina* entre los meses de cultivo fueron analizadas con un ANDEVA, después de transformar los datos a logaritmo natural para corregir la heterocedasticidad, no-normalidad y la no-aditividad (Zar, 1999). Los resultados fueron retransformados a su escala original para su presentación gráfica. La prueba utilizada de significancia de medias fue la prueba exacta de Fisher.

Tabla II. Genes de referencia evaluados para su estabilidad en músculo aductor de *Nodipecten subnodosus*.

Genes	Secuencia Cebadores (5'-3')	Tm (°C)	Tamaño fragmento (pb)	Eficiencia (E)
<i>rpl8</i>	F-CGTCATGGATACATCAAGGGT	63.5	153	0.95
	R-CAAACAGTCCAGTGTACATGCC	64.3		
<i>tub-α</i>	F-TTCAGCCTGATGGACAAATG	63.6	181	0.95
	R-TCTGGATGAAACAGCTGACG	64.1		
<i>ef-1α</i>	F-GTGCCAGTGGGTAGGGTAGA	63.9	199	1.0
	R-CTCCAGCAACGTTTCCTCTC	63.9		
<i>act-β</i>	F-CAGAGCAAGAGAGGTATCCTCACC	66.2	209	0.85
	R-GTTGAAGGTCTCGAACATGATCTG	65.8		
18S	F-GAAATTCTTGGATCGCCGTA	63.7	168	0.85
	R-GCCGAGTCATTGAAGCAACT	64.3		

Tomado de Llera-Herrera *et al.* (2012). La eficiencia (E) es la estimada en este trabajo.

6.6 Búsqueda de rutas metabólicas afectadas por condiciones experimentales de estrés nutricional, en el músculo aductor de organismos de *Nodipecten subnodosus* por medio de un microarreglo heterólogo y análisis de la expresión de la miostatina

Para conocer cuál es el efecto del estrés nutricional sobre la expresión de genes involucrados en la regulación de rutas metabólicas en el músculo aductor de *N. subnodosus*, se realizó la hibridación de un microarreglo heterólogo. Adicionalmente, se evaluó la expresión de la *miostatina* en los diferentes tejidos de esta especie para conocer si existe un efecto de la disminución de alimento sobre este gen.

6.6.1 Diseño experimental para la obtención del material biológico a utilizar en el microarreglo heterólogo

Se realizó un experimento (Exp. #1) en el Laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola del CIBNOR, con organismos adultos de *Nodipecten subnodosus* obtenidos de la Laguna Ojo de Liebre, Guerrero Negro Baja California Sur, bajo el siguiente diseño experimental. Se conformaron dos grupos, uno control (condiciones óptimas de alimentación) y otro experimental (condiciones sub-

óptimas de alimentación) con cinco organismos cada uno. Dichos organismos fueron previamente inducidos a desovar. La alimentación basada en el peso seco para el experimento se calculó con base en datos que habían sido obtenidos de organismos de la misma talla. Una vez conformados los grupos, se inició el experimento manteniendo al grupo control alimentado con el 6% de su peso seco y al grupo experimental con el 1.2% de su peso seco (20% del alimento proporcionado al grupo control) con una mezcla de microalgas de la antes llamada *Isochrysis galbana* y hoy llamada *Tisochrysis lutea sp. nov.* (Bendif *et al.*, 2013), *Chaetoceros calcitrans* y *Pavlova lutheri*. La duración del experimento fue de 35 días (del 18 de agosto al 19 de septiembre del 2011) y se mantuvo una temperatura de $24^{\circ} \text{C} \pm 1$. Al finalizar el experimento se tomaron muestras de manto, branquia, músculo aductor, gónada de la porción femenina y de la masculina y glándula digestiva las cuales fueron preservadas en solución acuosa de sal sulfato (Nolan y Bustin, 2008) (ver modo de preparación en Anexo VI). Las muestras se almacenaron a 4°C por aproximadamente 18 h y después se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.6.2 Extracción de ARN e hibridación del microarreglo

Se realizó la extracción de manto, branquia, músculo aductor, gónada (en porciones iguales de la parte femenina y de la masculina) y glándula digestiva de ocho individuos de *N. subnodosus* de los cuales, cuatro pertenecen al grupo experimental y cuatro al grupo control del Exp. #1. El ARN total obtenido de músculo aductor se utilizó para la hibridación del microarreglo, el resto de los tejidos además del músculo aductor se utilizaron para los análisis por qPCR. La extracción se realizó utilizando *TriPure Isolation Reagent* (Roche Applied Science) siguiendo el procedimiento del proveedor con modificaciones realizadas por De las Heras-Saldaña (2012) (Anexo II). El ARN se resuspendió en volúmenes de entre 80 μl de H_2O 0.1% DEPC (Invitrogen). Se cuantificó la concentración del ARN

obtenido de cada individuo utilizando un espectrofluorómetro (Thermo Scientific NanoDrop 1000). Se verificó su integridad por medio de la electroforesis horizontal de 2 µl de ARN obtenido de cada tejido en un gel de agarosa al 1% con buffer TAE a una concentración de 1X, por 60 min a 60 voltios. Para su visualización en el fotodocumentador con UV (BioDoc-It Imaging System, UVP) se utilizó una tinción fluorescente con *GelRed*. Un total de 30 µl de ARN de cada una de las muestras de cada tejido se almacenaron a -80 °C hasta su uso para los análisis de expresión génica por qPCR. Adicionalmente, 50 µl del ARN total obtenido de cada una de las muestras fue tratado con 5 µl de acetato de sodio 3M pH 5.2, se mezclaron por vortex, se agregaron 138 µl de etanol 100% frío, se mezclaron por inversión hasta homogenizarse y se conservaron a -80 °C por una noche. Las muestras fueron enviadas a la Unidad de Microarreglos de DNA del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (<http://microarrays.ifc.unam.mx/>) donde la preparación de las muestras para su procesamiento, hibridación e inicial colección de datos fue realizada. El experimento de hibridación heteróloga se llevó a cabo en un microarreglo de *Drosophila melanogaster* V.1.1.2 que contiene el genoma completo de esta especie (15,139 genes), empleando *pools* de ARN de músculo aductor de cada condición experimental (condiciones óptimas vs. condiciones sub-óptimas de alimentación). El ARN total (10 µg) en dos *pools* de los cuatro organismos de cada grupo experimental se purificó, cuantificó y sintetizó ADNc en presencia del nucleótido modificado aminoalil-dUTP, usando la enzima *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Posteriormente se incorporó una molécula fluorescente por medio de una reacción alcalina de los succimidil ésteres Alexa555 (rojo) y Alexa 647 (azul). El ADNc resultante fue concentrado y purificado usando *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Chatsworth, CA). Con el propósito de incrementar la confiabilidad estadística de los resultados y reducir al mínimo posible la identificación de falsos positivos, las comparaciones para la obtención de los genes diferencialmente expresados en *N. subnodosus* bajo condiciones de alimentación óptimas vs. sub-óptimas, se realizó el marcado y la hibridación de

cada comparación en *swap*: intercambio de los colorantes e hibridación de dos chips independientes, impresos en el mismo sustrato, hibridados, lavados y cuantificados en las mismas condiciones de acuerdo al modelo que se presenta en la figura 6.

6.6.3 Análisis del microarreglo

Cada uno de los chips se documentó en un escáner de lectura confocal Scan Array 4000 (Packard BioChip Technologies, Billerica, MA). Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa GenPix 4100 a una resolución de 5 μm . La detección de los spots, la media de las densidades de las fluorescencias de Alexa555 y Alexa647, la media del ruido de fondo y la normalización de los canales calculados se realizó con el programa para imágenes de microarreglos Array-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, L. P., Silver Spring, MD). La corrección del ruido de fondo, la normalización y la selección de los genes diferencialmente expresados fue realizada con el programa GenArise (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>), el cual fue desarrollado en la unidad de Computo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los genes con expresión diferencial fueron identificados por su Z-score (Cheadle *et al.*, 2003). GenArise calcula la media y la desviación estándar de cada punto y define el Z-score donde Z mide el número de desviaciones estándar de cada punto respecto a la media: $Z_i = (R_i - \text{media}(R)) / \text{sd}(R)$, donde Z_i es el Z-score de cada dato (punto), R_i es el logaritmo de la proporción (log-ratio) de cada dato y $\text{sd}(R)$ es la desviación estándar del logaritmo de la proporción de cada dato (Luna-Moreno *et al.*, 2007). Los genes con un Z-score mayor a 1.5 o menor a -1.5 fueron considerados como diferencialmente expresados. Para identificar de manera general las rutas metabólicas que han sido afectadas al someter organismos de *N. subnodosus* a estrés alimenticio se usó la herramienta KEGG Mapper-Search Pathway dentro de la plataforma de KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html). El proceso de análisis del microarreglo incluye la identificación de los genes con expresión diferencial, así

como su mapeo en rutas de interacción y asociación molecular por anotación ontológica del gen representado en cada sonda utilizando la herramienta en línea PANTHER classification system (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*) (Mi *et al.*, 2013).

Un análisis de enriquecimiento fue realizado usando el programa en línea WebGestalt (WEB-based Gene Set Analysis Toolkit; <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>) (Wang *et al.*, 2013), para identificar las categorías GO que fueron significativamente sobre-representadas en los procesos biológicos dentro de los listados de genes diferencialmente expresados identificados con el microarreglo, así como las vías metabólicas con base en las bases de datos de KEGG que fueron significativamente sobre-representadas. Este análisis se basa en la distribución hipergeométrica ($P < 0.05$) para los genes diferencialmente expresados en el músculo aductor de los organismos sometidos a bajo alimento. Estas herramientas han sido utilizadas apoyados en el hecho de que cada sonda impresa en el microarreglo representa un gen anotado con definiciones funcionales en GO, KEGG o la clasificación PANTHER.

La exploración de los resultados de expresión diferencial en estas herramientas gráficas mostrará el orden de interacción regulatoria, proceso biológico y ubicación dentro de rutas principales metabólicas.

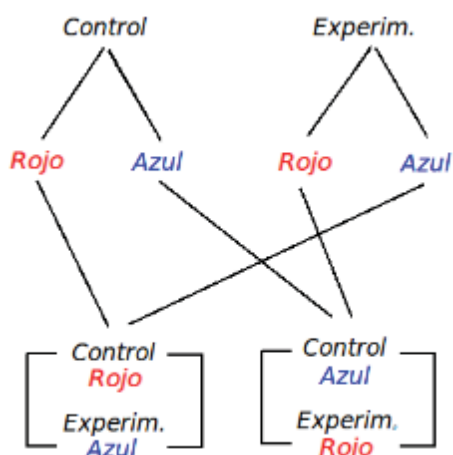


Figura 6. Modelo de hibridaciones en *swap* para organismos sometidos a condiciones experimentales de alimentación óptima (control) vs. sub-óptima (experimental).

6.6.4 Análisis de la expresión diferencial por PCR en tiempo real (qPCR) de la miostatina en los organismos de *Nodipecten subnodosus* sometidos a estrés nutricional

El volumen total de ARN de cada una de las muestras obtenidas como se menciona en la sección 6.5.2, fueron tratadas para eliminar el ADN genómico, se precipitaron con LiCl 4M, se sintetizó ADNc y se verificó la síntesis de cada muestra con el mismo protocolo mencionado en la sección 6.5.2. La amplificación por qPCR de la *miostatina* de *Nodipecten subnodosus* para el análisis de su expresión en un ciclo de crecimiento, se llevó a cabo con ambos pares de cebadores (*qMSTN_1-F/qMSTN_1-R* y *qMSTN_2-F/qMSTN_1-R*, Tabla I). La concentración de los cebadores *qMSTN-F/qMSTN-R* y *qMSTN_2-F/qMSTN_2-R*, utilizada en cada reacción de qPCR fue de 0.3 μ M. La evaluación de la estabilidad de los genes de referencia, las curvas de eficiencia y la amplificación por qPCR se realizaron como se menciona en la sección 6.5.3. El cálculo de la expresión relativa se realizó como se menciona en la sección 6.5.4. Los análisis estadísticos se mencionan en la sección 6.5.5.

6.7 Análisis de la expresión de la miostatina por PCR cuantitativo (qPCR) en glándula digestiva, manto y músculo aductor de organismos de *Nodipecten subnodosus* experimentalmente expuestos a condiciones de estrés nutricional.

Con la finalidad de corroborar el efecto del estrés nutricional que ya había sido observado en la expresión de la *miostatina* de *Nodipecten subnodosus*, se realizó un experimento con un diseño experimental más amplio, además de utilizar organismos de edad y origen diferentes a los ya utilizados. A continuación se describe la metodología empleada:

6.7.1 Diseño experimental para la obtención del material biológico

Organismos en condición post-desove producidos en laboratorio y crecidos hasta una talla mayor a 5 cm en campo, fueron transportados al Laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola del CIBNOR. En el laboratorio se aclimataron durante 15-20 días siguiendo la metodología de Ramírez *et al.* (1999). Se realizó el cálculo del peso seco de los organismos a partir de cinco organismos tomados al azar que fueron colocados en la estufa durante 72 h a aproximadamente 70 °C. Posteriormente su biomasa fue pesada individualmente y se obtuvo un promedio (3.67 g) y fue calculado el 2% ($3.67 \text{ gr} \times 0.02 = 0.0734 \text{ g}$ de peso seco por organismo). El alimento a proporcionar diariamente se calculó con base al número de los organismos a alimentar en el grupo control ($45 \text{ org} \times 0.0734 \text{ g} = 3.303 \text{ g}$ de peso seco total) el cual fue dividido entre las dos microalgas a utilizar (mezcla 1:1 de las microalgas *Tisochrysis lutea sp. nov.* y *Chaetoceros calcitrans*) ($3.303 \text{ g} / 2 = 1.6515 \text{ g}$ de cada microalga) y se dividió entre el peso seco de cada microalga: para *C. calcitrans* ($1.6515 \text{ g} / 34 \times 10^{-12} \text{ g/célula} = 4.8 \times 10^{10} \text{ células} \times \text{día}$) y para *T. lutea* ($1.6515 \text{ g} / 25 \times 10^{-12} \text{ g/célula} = 6.6 \times 10^{10} \text{ células} \times \text{día}$). Una vez calculada la cantidad de células de cada microalga a proporcionar por día para el grupo control (alto alimento), ésta era dividida entre la concentración de microalga (células por litro) obtenida diariamente ($(\text{células por día}) / (\text{células por litro}) = \text{volumen total de}$

cada microalga), y la cantidad obtenida se dividió entre las tres réplicas del grupo control. La cantidad a proporcionar para el grupo experimental (bajo alimento), se estimó a partir de lo calculado para el grupo control.

El experimento se llevó a cabo durante 29 días (del 24 de octubre al 21 de noviembre de 2013) iniciando siete días posteriores a un acondicionamiento previo. Al inicio del experimento se realizó la biometría de 15 individuos tomando las variables de peso (peso vivo o total, peso biomasa, peso de músculo y peso de glándula digestiva). Se tomó una muestra de gónada para análisis histológicos y se tomaron muestras de músculo aductor, glándula digestiva y manto que se preservaron en solución acuosa de sal sulfato para análisis de expresión génica (qPCR). De los organismos restantes, se separaron dos grupos (45 para el control=condiciones óptimas de alimentación y 45 para el experimental=condiciones sub-óptimas de alimentación), cada uno dividido en tres réplicas (n=15) y se colocaron en tanques de 200 l. Durante el experimento ambos grupos se mantuvieron a una temperatura del agua de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$. El grupo control (Alto alimento) se alimentó con el 2% del peso seco utilizando una mezcla 1:1 de las microalgas *T. lutea* y *C. calcitrans*. El grupo experimental (bajo alimento) se alimentó con el 0.4% (correspondiente al 20% del alimento proporcionado al grupo control) con la misma mezcla de microalgas. Durante el experimento se realizó diariamente la limpieza y el relleno de los tanques antes de alimentar a los organismos. La alimentación se realizó en dos partes debido a que se observó la presencia de pseudo-heces al comienzo del experimento. Al final del experimento se muestrearon nueve organismos por réplica dentro de cada grupo, de los cuales se realizó la biometría y los muestreos como se mencionó anteriormente.

6.7.2 Análisis de la expresión de la miostatina por qPCR en glándula digestiva, manto y músculo aductor de *Nodipecten subnodosus* expuestos experimentalmente a condiciones de estrés nutricional

Se realizó la extracción individual de ARN total de músculo aductor, glándula digestiva y manto de *N. subnodosus* de seis organismos de cada réplica (3) del grupo control (alimento normal) y seis organismos de cada réplica (3) del grupo experimental (bajo alimento), así como de ocho organismos del muestreo realizado al comienzo del experimento como se indica en la sección 6.7.1. El ARN se resuspendió en volúmenes de 50 μ l de H₂O libre de nucleasas. Se realizó la digestión del ADN genómico del volumen total de ARN utilizando 7 U de *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega), 1X de Buffer 5x y 20 U de *RNAsin Plus RNase Inhibitor* (Promega) y se incubó a 37 °C 60 min en horno de hibridación. Se adicionaron 0.1 volumen de LiCl 4M y 5 volúmenes de Etanol 100%, se mezclaron y se dejaron precipitar toda la noche a -20 °C. Se centrifugaron por 20 min a -4 °C a 14,000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se lavó el *pellet* con Etanol al 75% por 10 min en hielo y se centrifugaron por 10 min a -4 °C a 14,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se centrifugaron por 1 min en las mismas condiciones para eliminar el exceso de etanol. Se dejó secar el *pellet* por ~15 min en una campana de extracción y el ARN se resuspendió en volúmenes de 20 μ l de H₂O libre de nucleasas. El ARN se cuantificó, se verificó su integridad, se confirmó la eliminación del ADN genómico, se sintetizó ADNc y se confirmó la síntesis de ADNc por la amplificación por PCR punto final del gen β -Actina siguiendo el protocolo como ya ha sido mencionado anteriormente en la sección 6.5.2. Cada muestra de ADNc fue cuantificada con el espectrofluorómetro NanoDrop y fue analizada individualmente.

La amplificación por qPCR de la *miostatina* de *Nodipecten subnodosus* para el análisis de su expresión en organismos expuestos a condiciones de estrés nutricional, se llevó a cabo con ambos pares de cebadores (*qMSTN_1-F/qMSTN_1-R* y *qMSTN_2-F/qMSTN_1-R*, Tabla I). La concentración de los cebadores *qMSTN-F/qMSTN-R* y *qMSTN_2-F/qMSTN_2-R*, utilizada en cada

reacción de qPCR fue de 0.3 μ M. Se determinó la eficiencia de amplificación para ambos pares de cebadores de la *miostatina* y se realizó la amplificación individualmente del ADNc de glándula digestiva, manto y músculo aductor tanto del grupo control (alimento normal) como del grupo experimental (bajo alimento), así como del muestreo inicial con los cebadores para la *miostatina* con las condiciones utilizadas para los genes de referencia como se menciona anteriormente. La evaluación de la estabilidad de los genes de referencia para la normalización de la expresión del gen de la *miostatina* se menciona en la sección 6.5.3. La expresión relativa de la *miostatina* en *N. subnodosus* fue estimada como se menciona en la sección 6.5.4. Los análisis estadísticos se mencionan en la sección 6.5.5, los datos en este análisis no fueron transformados.

6.8 Cuantificación por PCR en tiempo real (qPCR) de la expresión del transcrito de la *miostatina* en diferentes tejidos de *Nodipecten subnodosus* durante un ciclo anual de crecimiento en un sitio de alta productividad

Con la finalidad de conocer si la expresión de la *miostatina* de *Nodipecten subnodosus* muestra una expresión diferencial en el músculo aductor por el sitio de cultivo en el que se encuentra la almeja se realizó un análisis de este gen durante un ciclo anual de crecimiento en un sitio de alta productividad. Adicionalmente, se analizó la expresión de este gen en otros tejidos de la almeja además del músculo aductor, para conocer si la expresión predominante en este último tejido es permanente durante todo el ciclo de crecimiento. Para lo cual se siguió la siguiente metodología:

6.8.1 Obtención de material biológico

Se colectaron organismos producidos en el Laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola del CIBNOR a partir de reproductores de la Laguna Ojo de Liebre y crecidos en el Estero de Rancho Bueno, Bahía Magdalena, ambos

sitios localizados en la costa del Pacífico de la Península de Baja California Sur. Se realizaron un total de cinco muestreos en los meses de febrero, abril, junio, agosto y octubre del 2013. En cada muestreo se realizaron evaluaciones del tamaño de los organismos (peso vivo total (g) y la longitud (cm)). En cada muestreo se colectaron un promedio de 40 organismos, de los cuales se seleccionaron al azar cinco organismos de donde se tomaron muestras de músculo aductor, manto, branquia, glándula digestiva y gónada. Las muestras fueron preservadas en solución acuosa de sal sulfato (Nolan y Bustin, 2008) (Anexo VI), almacenadas a 4 °C por aproximadamente 18 h y después se almacenaron a -20 °C hasta su uso. La temperatura fue obtenida con un termógrafo mantenido en el sitio de cultivo.

6.8.2. Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc)

Se realizó la extracción individual de ARN total de músculo aductor, manto, branquia, glándula digestiva y gónada de cinco individuos muestreados durante los cinco muestreos de febrero a octubre del 2013 como se indica en la sección 6.5.2. El ARN se resuspendió en 50 µl de H₂O libre de nucleasas. Se realizó la digestión del ADN genómico del volumen total de ARN como se menciona en la sección 6.7.2. Se realizaron dos precipitaciones con LiCl 4M (ver misma sección) y se resuspendió el ARN en volúmenes de 20 µl de H₂O libre de nucleasas. El ARN se cuantificó, se verificó su integridad, se confirmó la eliminación del ADN genómico, se sintetizó ADNc y se confirmó la síntesis de ADNc por la amplificación por PCR punto final del gen *β-Actina* siguiendo el protocolo como ya ha sido mencionado anteriormente en la sección 6.5.2. Cada muestra de ADNc fue cuantificada con el espectrofluorómetro NanoDrop y fue analizada individualmente.

6.8.3 Análisis de la expresión relativa de la miostatina en músculo aductor, manto, branquia, glándula digestiva y gónada de *Nodipecten subnodosus*

La amplificación por qPCR de la *miostatina* de *Nodipecten subnodosus* para el análisis de su expresión se llevó a cabo con ambos pares de cebadores ($qMSTN_1-F/qMSTN_1-R$ y $qMSTN_2-F/qMSTN_1-R$, Tabla I). La concentración de los cebadores $qMSTN-F/qMSTN-R$ y $qMSTN_2-F/qMSTN_2-R$, utilizada en cada reacción de qPCR fue de 0.3 μ M. La amplificación por qPCR se realizó como se menciona en la sección 6.5.3 para los genes de referencia. Se evaluó la estabilidad de los genes de referencia y se determinó la eficiencia de amplificación (E) de estos cebadores en el contexto de estas muestras como se indica en la sección 6.5.3 para los genes de referencia. El cálculo de la expresión relativa se realizó como se menciona en la sección 6.5.4. Los análisis estadísticos se mencionan en la sección 6.5.5, los datos en este análisis no fueron transformados.

7. RESULTADOS

7.1 Secuencias de músculo aductor, glándula digestiva y gónada de *Nodipecten subnodosus*

7.1.1 Obtención de fragmentos de secuencias de la miostatina con presuntas deleciones

La amplificación con los cebadores MSTN-F y MSTN-R (Tabla I) resultó en la obtención de un fragmento de ~600 pb en músculo aductor y de un fragmento de ~400 pb en glándula digestiva (Fig. 7). Aunque en una primera amplificación no se obtuvieron resultados de la amplificación con ADNc de gónada, se realizó una segunda amplificación de ADNc de gónada de donde se obtuvieron fragmentos de ~600 pb, para su clonación y secuenciación.



Figura 7. Productos de amplificación obtenidos por PCR de punto final de glándula digestiva (carril 1, 2 y 3), gónada (carril 4, 5 y 6) y músculo aductor (carril 7 y 8) de *Nodipecten subnodosus* muestreados en Ago-09. Carril 9 corresponde al control negativo y el carril 10 a control positivo de ADNc de músculo aductor ya probado. M se refiere al marcador de tamaño.

La secuenciación de los fragmentos obtenidos (~ 100, 400 y 600 pb) resultó en secuencias de 125 pb en glándula digestiva y gónada, de 405 pb en glándula digestiva y de 562 pb en músculo aductor. El alineamiento de estas secuencias muestran una deleción de 157 pb en la secuencia de 405 pb que abarca del nucleótido 202 al 359 de la secuencia de 562 pb, así como una deleción de 437 pb

en la secuencia de 125 pb que abarca del nucleótido 100 al 536 de la secuencia de 562 pb (Fig. 8).

```

mstn_562pb_N.sub      ACGAGAAATCGGAAGAAGAAAACGACATAATATGAAAGCAGCAGGGTGGCACCATTTTGA 60
mstn_125pb_N.sub     ACGAGAAATCGGAAGAAGAAAACGACATAATATGAAAGCAGCAGGGTGGCACCATTTTGA 60
mstn_405pb_N.sub     ACGAGAAATCGGAAGAAGAAAACGACATAATATGAAAGCAGCAGGGTGGCACCATTTTGA 60
*****

mstn_562pb_N.sub      TATACTAGATGAGGTACAAAAGTGGACCTACAGAACACATCTGAACCTTGGGCTTGTGTG 120
mstn_125pb_N.sub     TATACTAGATGAGGTACAAAAGTGGACCTACAGAACACA----- 99
mstn_405pb_N.sub     TATACTAGATGAGGTACAAAAGTGGACCTACAGGACACATCTGAACCTTGGGCTTGTGTG 120
*****

mstn_562pb_N.sub      CGAAGCTTTGGACGAGGCGGGCAATAAAGTGGTTATACTTCCCCGACGTTTGGAGCTGA 180
mstn_125pb_N.sub     ----- 180
mstn_405pb_N.sub     CGAAGCTTTGGACGAGGCGGGCAATAAAGTGGTTATACTTCCCCGACGTTTGGAGCTGA 180

mstn_562pb_N.sub      TGATGGATATGAGCCAATGCTGGATTTGCGCACATCTCTAAGGAAGTCAACACGCTCTAA 240
mstn_125pb_N.sub     ----- 240
mstn_405pb_N.sub     TGATGGATATGAGCCAATGCTG----- 202

mstn_562pb_N.sub      GAGATCTGCCGAACATATATTGTGACACGAGAGAAGAAAACGGCTTGTTCAGATATCTCT 300
mstn_125pb_N.sub     ----- 300
mstn_405pb_N.sub     -----

mstn_562pb_N.sub      AGAAGTCGATTTTCGTCGCGTTTGGGTGGGACTTTGTGATAGCTCCACTTACATATGCTGC 360
mstn_125pb_N.sub     ----- 360
mstn_405pb_N.sub     -----C 203

mstn_562pb_N.sub      CTATTACTGCGCCGGCGAAATGTAAGGTGAACAAATTGGACGATACGTTACATGCTCATGI 420
mstn_125pb_N.sub     ----- 420
mstn_405pb_N.sub     CTATTACTGCGCCGGCGAAATGTAAGGTGAACAAATTGGACGATACGTTACATGCTCATGI 263

mstn_562pb_N.sub      GATCCAGCAAGCACCCTCCCCAACCTTGAGTCAGCCCCAGTCAGCCATAAGCAACGTCGG 480
mstn_125pb_N.sub     ----- 480
mstn_405pb_N.sub     GATCCAGCAAGCACCCTCCCCAACCTTGAGTCAGCCCCAGTCAGCCATAAGCAACGTCGG 323

mstn_562pb_N.sub      TCCCTGTGCACTCCGACTAAAATGICCGATCTAGCAATGCTTTTCTTCGACCACAATC 540
mstn_125pb_N.sub     -----ACTC 103
mstn_405pb_N.sub     TCCCTGTGCACTCCGACTAAAATGICCGATCTAGCAATGCTTTTCTTCGACCACAATC 383
*****

mstn_562pb_N.sub      GAACATAGCATTGACGCGATTG 562
mstn_125pb_N.sub     GAACATAGCATTGACGCGATTG 125
mstn_405pb_N.sub     GAACATAGCATTGACGCGATTG 405
*****

```

Figura 8. Alineamiento de las secuencias de los fragmentos de 125 pb, 405 pb y 562 pb obtenidos de la amplificación de una secuencia parcial del transcrito del gen de la *miostatina* en *N. subnodosus*. Los asteriscos (*) muestran los nucleótidos similares en las tres secuencias.

En el gradiente de $MgCl_2$ realizado con ADNc de la glándula digestiva de cuatro organismos diploides de *N. subnodosus*, se obtuvieron fragmentos de ~600 pb en los cuatro organismos en las diferentes concentraciones de $MgCl_2$ utilizadas. Para el organismo tres en la concentración de 2.0 mM se observó adicionalmente un fragmento de ~400 pb (Fig. 9) validando esto la presencia de transcritos alternos en un mismo organismo. La secuenciación de estos fragmentos indicó que son idénticos a los antes obtenidos para cada uno de los tamaños.

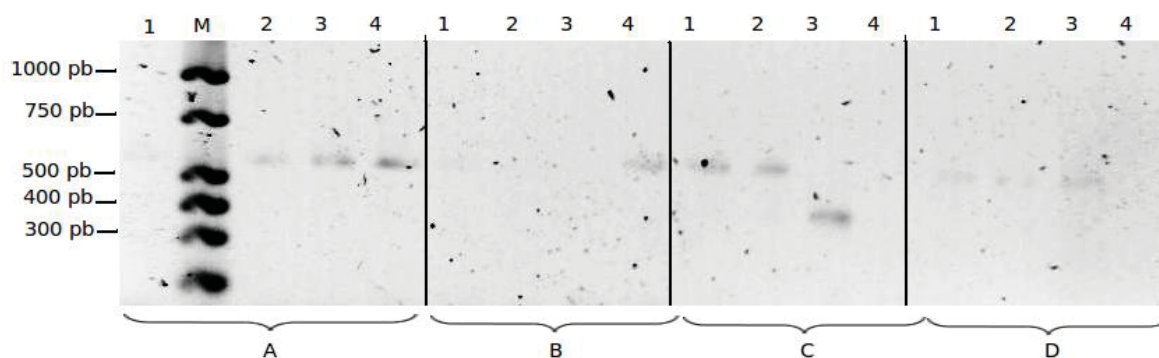


Figura 9. Productos de amplificación obtenidos de gradiente de $MgCl_2$ realizado por PCR de punto final de ADNc de glándula digestiva de cuatro organismos de *Nodipecten subnodosus* muestreados en Ago-09 (denominados del 1 al 4 en cada concentración de $MgCl_2$). Las letras A, B, C y D se refieren a las concentraciones de 3.0, 2.5, 2.0 y 1.5 mM de $MgCl_2$ respectivamente utilizadas en la amplificación. M se refiere al marcador de tamaño.

7.1.2 Similitud de las secuencias obtenidas con proteínas homologas

El análisis *in silico* de similitud por Blastp de la secuencia proteica de 187 aminoácidos (562 pb) (Fig.10) dio como resultado una similitud del 100% de aminoácidos idénticos con la secuencia de *Argopecten irradians* (GenBank ADL60139.1) y con la secuencia de *Chlamys farreri* (GenBank ACB87200.1).

<u>R E I G R R K R H N M K A A G W H H F D</u>	20
ACGAGAAATCGGCAGAAGAAAACGACATAATATGAAAGCGGCAGGGTGGCACCATTTTGA	60
<u>I L D E V Q K W T Y R T H L N L G L V V</u>	40
TATACTAGATGAGGTACAAAAGTGGACCTACAGAACACATCTGAACCTTGGGCTTGTGT	120
<u>E A L D E A G N N L V I L P P T F G A D</u>	60
CGAAGCTTTGGACGAGGCGGGCAATAACTTGGTTATACTTCCCCGACGTTTGGAGCTGA	180
<u>D G Y E P M L D L R T S L R K S T</u> R S K	80
TGATGGATATGAGCCAATGCTGGATTTGCGCACATCTCTAAGGAAGTCAACACGCTCTAA	240
R S A E L Y C D T R E E T A C C R Y P L	100
GAGATCTGCCGAACTATATTGTGACACGAGAGAAGAAACAGCTTGTTCAGATATCCTCT	300
<u>E V D F V A F G W D F V I A P L T Y A A</u>	120
AGAAGTCGATTTTCGTCGCGTTTGGGTGGGACTTTGTGATAGCTCCACTTACATATGCTGC	360
<u>Y Y C A G E C K G E Q L D D T L H A H V</u>	140
CTATTACTGCGCCGGCGAATGTAAAGGTGAACAATTGGACGATACGTTACATGCTCATGT	420
<u>I Q Q A P S P T L S Q P Q S A I S N V G</u>	160
GATCCAGCAAGCACCGTCCCCAACCTTGAGTCAGCCCCAGTCAGCCATAAGCAACGTCGG	480
<u>P C C T P T K M S D L A M L F F D H N S</u>	180
TCCCTGTTGCACTCCGACTAAAATGTCCGATCTAGCAATGCTTTTCTTCGACCACAAC	540
<u>N I A L T R L</u>	187
GAACATAGCATTGACGCGATTG	562

Figura 10. Traducción conceptual de la secuencia parcial de 562 pb de la *miostatina* obtenida en *N. subnodosus*. La secuencia subrayada es parte del dominio N-terminal del pro-péptido. En negritas se muestra el sitio de procesamiento proteolítico (RXXR) de la MSTN. El resto de la secuencia es el dominio C-terminal que corresponde al ligando activo.

La traducción conceptual con el marco de lectura +2 de la secuencia nucleotídica de 405 pb en glándula digestiva dio una secuencia de 135 aminoácidos, conteniendo 67 aminoácidos del dominio N-terminal del pro-péptido, a partir de donde se pierde el marco de lectura dando como resultado una secuencia con seis codones de paro (Fig. 12), con la subsecuente pérdida del sitio de procesamiento proteolítico de 4 aminoácidos y aminoácidos del dominio C-terminal observados en la secuencia anterior de 562 pb (Fig. 11).

R E I G R R K R H N M K A A G W H H F D	20
ACGAGAAATCGGAAGAAGAAAACGACATAATATGAAAGCAGCAGGGTGGCACCATTTTGA	60
I L D E V Q K W T Y R T H L N P G L V V	40
TATACTAGATGAGGTACAAAAGTGGACCTACAGAACACATCTGAACCCTGGGCTTGTGT	120
E A L D E A G N N L V I L P P T F G A D	60
CGAAGCTTTGGACGAGGCGGGCAATAACTTGGTTATACTTCCCCGACGTTTGGAGCTGA	180
D G Y E P M L P I T A P A N V K V N N W	80
TGATGGATATGAGCCAATGCTGCCTATTACTGCGCCGGCGAATGTAAAGGTGAACAATTG	240
T I R Y M L M * S S K H R P Q P * V S P	100
GACGATACGTTACATGCTCATGTGATCCAGCAAGCACCGTCCCCAACCTTGAGTCAGCCC	300
S Q P * A T S V P V A L R L K R P I * Q	120
CAGTCAGCCATAGCAACGTCGGTCCCTGTTGCACTCCGACTGAAACGTCGGATCTAGCA	360
C F S S T T T R T * H * R D T	135
ATGCTTTTCTTCGACCACAACCTCGAACAATAGCATTGACGCGATTG	405

Figura 11. Traducción conceptual de la secuencia parcial de 405 pb obtenida de la MSTN de *N. subnodosus*. La marca (+) muestra donde cambia el marco abierto de lectura debido a la delección de 157 pb encontrada. Los asteriscos indican los codones de paro.

La traducción conceptual con el marco de lectura +2 de la secuencia nucleotídica de 125 pb en glándula digestiva dio una secuencia de 41 aminoácidos, conteniendo 30 aminoácidos del dominio N-terminal del pro-peptido donde se encuentra un codón de paro. Después de esta secuencia se pierde el marco de lectura dando como resultado dando como resultado una proteína trunca (Fig. 12).

R E I G R R K R H N M K A A G W H H F D	20
ACGAGAAATCGGAAGAAGAAAACGACATAATATGAAAGCAGCAGGGTGGCACCATTTTGA	60
I L D E V Q K W T Y R T Q L E H S I D A	40
TATACTAGATGAGGTACAAAAGTGGACCTACAGAACACAACCTCGAACATAGCATTGACGC	120
I	41
GATTG	125

Figura 12. Traducción conceptual de la secuencia parcial de 125 pb obtenida de la *miostatina* de *N. subnodosus*. La marca (+) muestra donde cambia el marco abierto de lectura debido a la delección de 437 pb encontrada.

7.2. Caracterización del transcrito completo de la *miostatina* en músculo aductor de *Nodipecten subnodosus* y obtención de transcritos parciales en glándula digestiva y gónada

La amplificación con el cebador RACEMSTN1-F en dirección 5' a partir de ADNc de músculo aductor resultó en dos fragmentos: el primero de aproximadamente 1550 pb y el segundo de aproximadamente 1400 pb (carril 5; Fig. 13a). La amplificación en dirección 3' (cebador RACEMSTN3-R) resultó también en dos fragmentos, uno de 2000 pb y otro de aprox. 300 pb. (carril 6; Fig. 13a). Los fragmentos obtenidos tanto en gónada como glándula digestiva fueron de tamaño similar, uno de aproximadamente 2000 pb y otro de aproximadamente 300 pb de bases (mismos tamaños de los obtenidos en músculo aductor cuando se amplificó en dirección 3') (carriles 2 y 4; Fig. 13a). En una segunda amplificación en gónada y glándula digestiva en dirección 5' (Fig. 13b), se obtuvo un fragmento sólo en glándula digestiva, mostrando una banda de muy baja intensidad con un tamaño de aproximadamente 1500 pb (carril 1; Fig. 13b). En la tercera amplificación en gónada y glándula digestiva en dirección 5' (Fig. Xc), se obtuvo un fragmento sólo en gónada de aproximadamente 1550 pb (carril 2; Fig. 13c) el cual presenta una banda de muy baja intensidad.

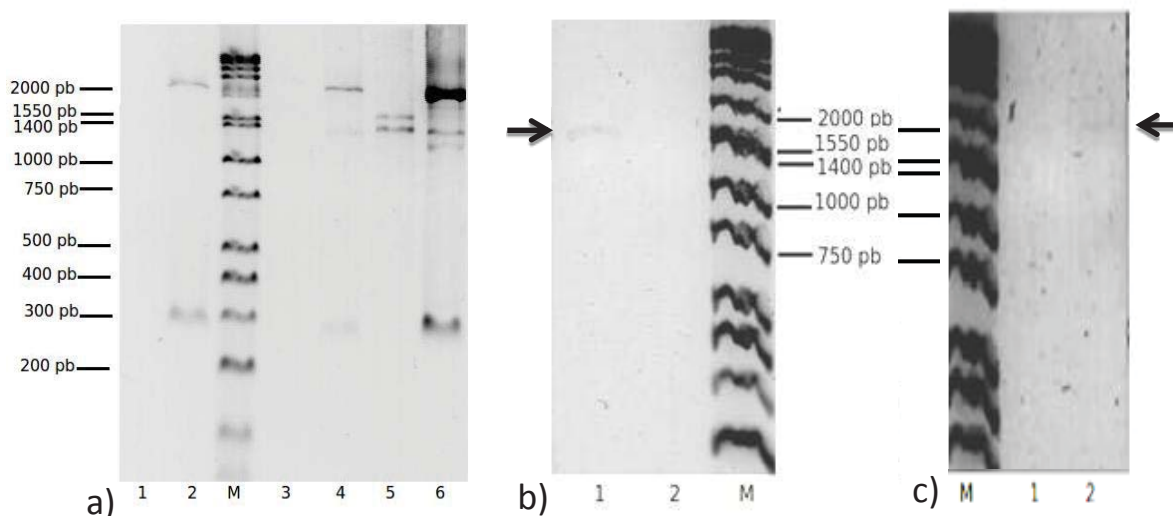


Figura 13.- Amplificación con el par de cebadores *RACEMST1-F* (dirección 3') y *RACEMST3-R* (dirección 5') de ADNc RACE de: a) gónada en dirección 5' (carril 1) y en dirección 3' (carril 2), marcador de peso molecular (M); de glándula digestiva en dirección 5' (carril 3) y en dirección 3' (carril 4); en músculo aductor en dirección 5' (carril 5) y en dirección 3' (carril 6). b) glándula digestiva (carril 1) y de gónada (carril 2), marcador de peso molecular (M); y c) en dirección 5' de gónada (carril 2), de glándula digestiva (carril 1) y marcador de peso molecular (carril 1).

Músculo aductor. Las secuencias obtenidas de las amplificaciones en músculo aductor de *N. subnodosus* en dirección 5' fueron de 1397 y 1572 pb, y en dirección 3' fue de 585 pb. El alineamiento de la secuencia corta hacia 5' con el de 3' resultó en un transcrito de la *miostatina* de 3478 pb, y el de la secuencia larga hacia 5' con el de 3' en un transcrito de 3655 pb (Fig. 14). Ambos transcritos contienen 1380 pb del marco abierto de lectura (ORF) el cual codifica para una proteína de 459 aminoácidos. Se identificaron 57 pb de la UTR 5' en el transcrito corto y 234 pb en el largo. Se identificaron 2041 pb de la UTR 3' con una secuencia poli-A (29 pb) que comienza en la posición 3626 pb de la secuencia completa del transcrito. El análisis *in silico* de las UTR 5' tiene un presunto uORF (por sus siglas en inglés Upstream Open Reading Frame) en la posición 7 a la 126 y una secuencia TATAAAA (caja TATA) en la posición 142 a 151, localizada 27 pb hacia arriba del primer nucleótido del transcrito corto. El análisis de la UTR 3' muestra varios

elementos *cis*-reguladores los cuales han sido descritos como elementos involucrados en la regulación positiva y negativa de la traducción: cuatro K-box, cuatro MBE (por sus siglas en inglés de Musashi binding sites), un UNR binding site y la señal de poliadenilación PAS (Polyadenylation Signal). El análisis de la secuencia de la proteína con *ProP 1.0* confirmó que la secuencia obtenida contiene un péptido señal entre los residuos 19 y 20 y permitió identificar entre los residuos 339-342 de la secuencia de la *miostatina* en *N. subnodosus* con un score de 0.804, el sitio de procesamiento proteolítico (RXXR) que se identifica por la secuencia RSKR. Adicionalmente, se identificó un segundo sitio de reconocimiento de proprotein convertasas en la posición 266-269 con un score de 0.665. El análisis con *Blastp* indicó que la secuencia de aminoácidos de la *MSTN* obtenida de músculo aductor de *N. subnodosus* tiene un 89% de similitud con la secuencia de *Argopecten irradians* (GenBank ADL60139.1) y un 87% con la secuencia de *Azumapecten farreri* (GenBank ACB87200.1). La mayor similitud se puede observar en el extremo C-terminal que corresponde al ligando activo. Nueve residuos de cisteína fueron identificados después del sitio proteolítico en la secuencia que corresponde al ligando activo. El alineamiento de las UTR 3' realizado en las especies de pectínidos (Fig. 15) permitió la identificación de secuencias K-box en otras especies en las mismas posiciones que fueron previamente identificadas en *N. subnodosus*.

```

1 ACTGTTATGCAAGCATAGTGTGGTAGGGGTGGGCAGATTAGCAACCCCTAAAAGCTAACCCCTGTGTTGTACAATCAGCGAGAAGTC 90
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
91 TGTCAACTCTTCAGCTGGACCGATGCGATGCGATAGCTTGACCCTGGGTACATAAAAAGCGTGTCTCAGGGCCCGGCCACCGAACCATC 180
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
181 TCTAACGTAACCGCTATACCTGTACAATCAGCTGATAGCTGTCAACGAGAAAAGGatgcatcgccctattccatccctctctgtctctg 270
1 M H R L F H P L L F S A 12
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
271 ctgttctctgcagtgatgctggggcgtcaaccaaacaaacgaaacgtatcaaatgttagaacaggagagtaaggaactgacttccatt 360
13 L F S A V Y A G A I N Q T N E T Y Q M L E Q E S K E L T S I 42
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
361 ccaaacacgatacattaacagacgattttatgatgatgattatttcagaaatttaccggagtgactttggagcgtgaacgcaac 450
43 P K H D T L T D D F Y D D D Y Y S E I L P E L T L E R E R N 72
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
451 aacgatgttaaatcgatgctgaatgatacgaacaatgcaacatcatattatgactatgaagaagtagaagttaaaaatcctaaacat 540
73 N D V E Y D M L N D T T N A T S Y Y D Y E E V E V K N P K H 102
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
541 aaaaagtgtcaaatatgtagaatcagagatgaacaaaaacgacatcgagtggaagcaataaaaaacagaatttcacatgcttgaactg 630
103 K K C Q I C R I R D E Q K R H R V E A I K N R I S H V L K L 132
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
631 gatgtacttggcatgcccacacgacagcaaacgattaccgaaggtaccctcgttttacgattacgtgaaaaatgaaaatgctcaa 720
133 D V L G M P N T T A K R L P K V P S F L R L R E K Y E N A Q 162
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
721 atgcaatcggatttctccgagtagccgaaaggaagaaacgactgaggtaccaggatgtacaagaggaatacggacagcggaaaggcgtat 810
163 M Q S D S P S S R K E E R L R Y Q D V Q E E Y G Q P E R T Y 192
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
811 agcttggcaaaagaactgcccgctgacatggaccagcagtttccggacaccatataatgtgatgcaagatccacagaaaagaaacc 900
193 S F A K E L P A D M D Q Q F P D T I Y F D M Q D S P E K E T 222
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
901 aacaagccttggatggtctacatcagcccgacgacatcatagacagaaatgatgactgaaatatatgtttacacaatgacccaccct 990
223 N K A L L W V Y I S P D D I I D R N M T E I Y V Y T I D P P 252
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
991 ggaaaatttagtaaaagtcccccacaaagagaaaatcggtagaagaaaacgacataatgaaagcagcaggggtggcaccattttgatata 1080
253 G K F S K V P T K R E I G R R K R H N M K A A G W H H F D I 282
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1081 ctgatgaggtacaaaagtggacctacagaacacatctgaacctggggctgttgcgaagctttggagcagggcgggcaataacttggtt 1170
283 L D E V Q K W T Y R T H L N L G L V V E A L D E A G N N L V 312
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1171 atacttccccgactgttgagctgatgatgatgatgagccaatgctggatttgcgcacatctctaaggaagtcacacgctcctaagaga 1260
313 I L P P T F G A D D G Y E P M L D L R T S L R K S T R S K R 342
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1261 tctgcgcaactatattgtgacagagagaaagaaacagctgttgcagatccctcagaagtcgatctcgtcgcgttgggtgggacttt 1350
343 S A E L Y C D T R E E T A C C R Y P L E V D F V A F G W D F 372
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1351 gtgatagctccactacatagctgccttactgcgcccggcgaatgtaaaagtgaaacaattggacgatacgttacagctcagtgatc 1440
373 V I A P L T Y A A Y Y C A G E C K G E Q L D D T L H A H V I 402
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1441 cagcaagcaccgtcccaactctgagtcagcccagtcagccataagcaacgctcgtcctgttgcactccgactaaaatgcccgatcta 1530
403 Q Q A P S P T L S Q P Q S A I S N V G P C C T P T K M S D L 432
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1531 gcaatgcttttctcgaccgcaactcgaacatagcattgacgcggttgc caagtgaaagtagacagatgtggttgcgtaagTGAAG 1620
433 A M L F F D R N S N I A L T R L P R M K V D R C G C A * 459
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1621 AATACAAAAAACAATGAAAGAAAGGAACAGGACCTGTGATCTCGAAATAGTAAAGAAATGCTGTTGGACGGAATGATTGA 1710
1711 AACTATTTGCTTTCCACCACCTTTCTTCCTGACTGCAATGCTGTTGTGACAGACTAGTAAGACCGGCATTGAGAGAATGAAATGCTTTGC 1800
1801 AAACGACAGAGAACGACTGAATAGGGCAATAGTATCAAGTATAATAACATTACCAGTTCTTATTTATCGAGTCTGCTGTGATGACA 1890
1891 CGAAATCATAGGATAGCCTCGTGTGGGAAAGTATCACCTAAAAGGTTATGAAGAAGCGTATTGTTACATTGTTGTTGCTTTTGG 1980
1981 TGCTTTTAGAGGTAAACAACGCATCACGGTGTGTACATCATACATATTACCGTCTTTCTGTCGATCTCATTATGATGTCATTTTCCG 2070
2071 TCATAGTTCGCTAAAAGGACAACCTTTCTGCCATAACACTATGTAAGTGTATGCTATCGTCACTTCTACATAGATCAATAACAACTGTGC 2160
2161 TACAATTCGGAAGCTTTAACTCTGTTGATTTGTCGAATGATATATCGTTGTC CCAATTCACGTTACTGCAATATGTTACCCACA 2250
2251 AATGTTCTGTTATTTGAATTGATTTCTGTCAGATGGGCACTTTTACAAATAATTAATAATTTTGTAGCGTCTGTC AAAATGTAA 2340
2341 AGAGGTATTATCATTAATCTAATTATAGGCAAAATGGTTGTTTCAAATATGTGAACCTAGATGTTACAATTTAATAACAAATGTATGA 2430
2431 CCATTGTTTACAAATGAATTTATTATAAATAGATATGAATCTTTATTCAATAATAAATAATTTAGTGTGGAGTTAACTCTGAAACAGTA 2520
2521 TTGTTATTAATAACCATTTGTAATGTTAAATATATATCGAATATAGGATAAATGTACATTTGATGTATATTGTAATGACCTTGTGAC 2610
2611 CTACTGTAATTTATACAAATACGAAACGAAATCAATAAAGGTAATCGATCCACATCAATAGATATAATTC AAAATATTTTTTAAATGAAA 2700
2701 ATAAAAAGGAAAGTATCAATTTTAAATTTAAATTTTATAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA 2790
2791 GACACACTAAAAAGCGTATCTCATGTGACAATGACAATATATTTTTTTCTTTCTTTCTCGTAATTCGTCTCATAATCTGTAATTTATT 2880
2881 TGTTTCACTTGTCCATATTTTAGATTATTTGCTTAAATGTTTAAATCCAAATAATTTGGACCTTGGTGTGAGTACATTCGAAATCAATGA 2970
2971 TGTAACATTAAGCATATATATTTTGTAGCCGACCGATCAAGCATGACGCTGAAAATTATAACAGTTGGCAGTGTGACAATGTA 3060
3061 TGACATTTTAAATCTGTATGAGCTATGTC AACCTGTGAAATTTATTTGTTGGTGGTGGTACATATGTTAAATATGTTCTTTAAATGTGC 3150
3151 TGACGATGTCAATATCATTTTGTGTTTATTTACAAATGATCATCAGAAAGCTTATACATTAACGAAACAGCATAATCGCTGTGATTA 3240
3241 ATATAACATGTATATATTGCAAGCAGGAGTGTACACTTTATTTCGATTGAAATGATATTGGCTTGTGATGCAATTCAGGAGG 3330
3331 ATTAGGGCAGTAGATGACGTAGACCATATTTCTTGACTTCATTCATGCTTCTTTTGCATTCCAAAATCTCATAGCTATATGTGATTCAT 3420
3421 ACACCTAGTAGATTATAATACATGATCAAAATGTAATAAATAAATTTCAATCATAGCGTTAAACGTTGTTGTGCAGACGCCATACATTT 3510
3511 AGAGACCAACTGTTCTATGTTCAATTACGAGAAATGTTTTATTGTGAGAAATCGGAGTGCCTTCTGTGATGATTGACATCGGGAGATCT 3600
3601 GGTGATGAAAAAATCTTTTATCGAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3655

```

Figura 14. Secuencia nucleotídica y su traducción conceptual a proteína de la *miostatina* de *Nodipecten subnodosus*. La secuencia codificante está representada en letras minúsculas y la traducción a aminoácidos en letras mayúsculas. La UTR 5' larga está en letras mayúsculas de color gris claro con la caja-TATA resaltada en gris claro. El uORF (upstream ORF) del UTR 5' está subrayado con guiones. La UTR 5' corta está subrayada. El sitio de escisión del péptido señal está resaltado en gris oscuro. El sitio de procesamiento proteolítico adicional (RRKR) y la secuencia del sitio de procesamiento proteolítico (RSKR) están resaltados en negro. Los nueve residuos de cisteínas conservados en el dominio maduro de la proteína se encuentran marcadas en recuadros de color gris oscuro. El codón de paro está indicado con un asterisco. Los sitios MBE (Musashi binding site) se muestran marcados con recuadros. Los sitios UNRbs (UNR binding site) están subrayados con doble línea. Los K-box están escritas con letras cursiva/negrita resaltadas en gris oscuro. La señal de poliadenilación (PAS) está escrita con letras cursivas subrayada.

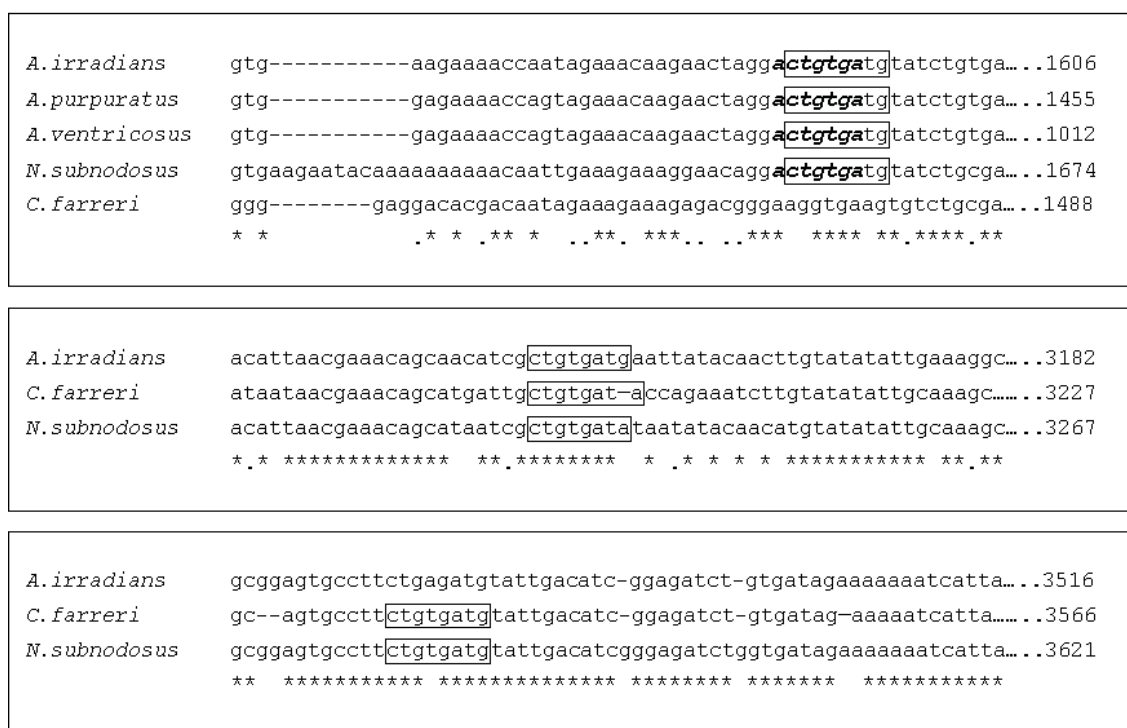


Figura 15. Alineamiento de UTR 3' de las especies de pectínidos mostrando los sitios con K-boxes: *Argopecten irradians* (JN684903.1), *A. purpuratus* (KC771285.1), *A. ventricosus* (datos no publicados), *Chlamys farreri* (EU563852.2) y *Nodipecten subnodosus* (KF471120). Las K-boxes están mostradas en recuadros. La secuencia con un sitio de reconocimiento de miRNA (ACTGTGA) está mostrada con letras cursivas/negritas.

Glándula digestiva: La secuencia obtenida de la amplificación en dirección 5' fue de 1397 pb y en dirección 3' fue de 233 pb. El alineamiento de estas dos secuencias resultó en un transcrito de 1438 pb. Esta secuencia contiene 1380 pb del marco abierto de lectura (ORF) el cual codifica para una proteína de 459 aminoácidos al igual que en músculo aductor (Fig. 16). El tamaño del UTR 5' del transcrito obtenido en glándula digestiva tiene el mismo tamaño (57 pb) que el encontrado en el transcrito corto aislado en músculo aductor. Al igual que en músculo aductor el análisis con *SignalP* y la similitud con las secuencias de la *MSTN* en otras especies de pectínidos presentan los mismos resultados.

Gónada: La secuencia obtenida de la tercera amplificación con el ADNc de gónada en dirección 5' fue de 920 pb, la cual corresponde al marco abierto de lectura (ORF) que codifica para una proteína de 284 aminoácidos. Se identificaron 66 pb de la UTR 5'.

Al comparar las secuencias nucleotídicas obtenidas de músculo aductor (N.sub_MUS_1 y N.sub_MUS_2), de gónada (N.sub_GON) y glándula digestiva (N.sub_GD) de *N. subnodosus* con el primer juego de cebadores realizado, se identificó que en músculo aductor y glándula digestiva el sitio de inicio de transcripción se encuentra ubicado en la misma parte de la secuencia (233-235 pb) (Fig. 16). Al igual que en la secuencia proteica de la *MSTN* obtenida de músculo aductor, el sitio de procesamiento proteolítico (RXXR) en la secuencia de aminoácidos tanto de gónada como glándula digestiva está presente pero, mientras que en la secuencia de glándula los nueve residuos de cisteína fueron identificados después del sitio proteolítico, en la de gónada sólo se identificaron 7 (Fig. 17) debido a que las secuencias obtenidas de gónada en dirección 3' no han sido aún obtenidas.

N.sub_MUS_1	atagcttgaccactgggtcactataaaagcgtgctcagggccgcccgaacacattctc	180
N.sub_MUS_2	-----atctc	5
N.sub_GON	-----	
N.sub_GD	-----atctc	5
N.sub_MUS_1	taacgtaaccgctatacctgtacaatcagctgatagctgtcaacgagaaaggatgcatcg	240
N.sub_MUS_2	taacgtaaccgctatacctgtacaatcagctgatagctgtcaacgagaaaggatgcatcg	65
N.sub_GON	-----	
N.sub_GD	taacgtaaccgctatacctgtacaatcagctgatagctgtcaacgagaaaggatgcatcg	65
N.sub_MUS_1	cctattccatcctctcctgttctctgcgctgttctctgcagtgatgctggggcgatcaa	300
N.sub_MUS_2	cctattccatcctctcctgttctctgcgctgttctctgcagtgatgctggggcgatcaa	125
N.sub_GON	-----	
N.sub_GD	cctattccatcctctcctgttctctgcgctgttctctgcagtgatgctggggcgatcaa	125
N.sub_MUS_1	ccaaacaaacgaaacgtatcaaatgttagaacaggagagtaaggaactgacttccattcc	360
N.sub_MUS_2	ccaaacaaacgaaacgtatcataatgttagaacaggagagtaaggaactgacttccattcc	185
N.sub_GON	-----	
N.sub_GD	ccaaacaaacgaaacgtatcaaatgttagaacaggagagtaaggaactgacttccattcc	185
N.sub_MUS_1	aaaaacagatacattaacagacgattttatgatgatgattattattcagaaattttacc	420
N.sub_MUS_2	aaaaacagatacattaacagacgattttatgatgatgattattattcagaaattttacc	245
N.sub_GON	-----	
N.sub_GD	aaaaacagatacattaacagacgattttatgatgatgattattattcagaaattttacc	245
N.sub_MUS_1	ggagttgactttggagcgtgaacgcaacaacgatgttgaatacgatatgctgaatgatac	480
N.sub_MUS_2	ggagttgactttggagcgtgaacgcaacaacgatgttgaatacgatatgctgaatgatac	305
N.sub_GON	-----	
N.sub_GD	ggagtcgactttggagcgtgaacgcaacaacgatgttgaatacgatatgctgaatgatac	305
N.sub_MUS_1	gacaaatgcaacatcattatgactatgaagaagtagaagttaaaaaatcctaaacataa	540
N.sub_MUS_2	gacaaatgcaacatcattatgactatgaagaagtrgaagttaaaaaatcctaaacataa	365
N.sub_GON	-----	
N.sub_GD	gacaaatgcaacatcattatgactatgaagaagtagaagttaaaaaatcctaaacataa	365
N.sub_MUS_1	aaagtgtcaaatatgtagaatcagagatgaacaaaaacgacatcgagtggaagcaataaa	600
N.sub_MUS_2	aaagtgtcaaatatgtagaatcagagatgaacaaaaacgacatcgagtggaagcaataaa	425
N.sub_GON	-----	
N.sub_GD	aaagtgtcaaatatgtagaatcagagatgaacaaaaacgacatcgagtggaagcaataaa	425
N.sub_MUS_1	aaacagaatttcacatgtcttgaaaactggatgtacttggcatgcccacacgacagcaaa	660
N.sub_MUS_2	aaacagaatttcacatgtcttgaaaactggatgtacttggcatgcccacacgacagcaaa	485
N.sub_GON	-----acagcaaa	8
N.sub_GD	aaacagaatttcacatgtcttgaaaactggatgtacttggcatgcccacacgacagcaaa	485

N.sub_MUS_1	acgattaccgaaggtaaccctcgtttttacgattacgtgaaaaatagaaaaatgctcaaat	720
N.sub_MUS_2	acgattaccgaaggtaaccctcgtttttacgattacgtgaaaaatagaaaaatgctcaaat	545
N.sub_GON	acgattaccgaaggtaaccctcgtttttacgattacgtgaaaaatagaaaaatgctcaaat	68
N.sub_GD	acgattaccgaaggtaaccctcgtttttacgattacgtgaaaaatagaaaaatgctcaaat	545

N.sub_MUS_1	gcaatcggattctccgagtagccgaaaggaagaacgactgaggtaccaggatgtacaaga	780
N.sub_MUS_2	gcaatcggattctccgagtagccgaaaggaagaacgactgaggtaccaggatgtacaaga	605
N.sub_GON	gcaatcggattctccgagtagccgaaaggaagaacgactgaggtaccaggatgtacaaga	128
N.sub_GD	gcaatcggattctccgagtagccgaaaggaagaacgactgaggtaccaggatgtacaaga	605

Figura 16.- Alineamiento de la secuencias nucleotídicas de la *miostatina* obtenidas de músculo aductor, gónada y glándula digestiva de *Nodipecten subnodosus* a partir de la amplificación con el primer juego de cebadores realizada. En un recuadro se observan los dos sitios de inicio de transcripción observados.


```

N.sub_GON_284aa -----
N.sub_MUSC_459a I L P E L T L E R E R N N D V E Y D M L N D T T N A T S Y Y D Y E E V E V K N P K H K K C Q I C R I R D E Q K R H R V E
N.sub_GD_459aa  I L P E S T L E R E R N N D V E Y D M L N D T T N A T S Y Y D Y E E V E V K N P K H K K C Q I C R I R D E Q K R H R V E

N.sub_GON_284aa -----MQSDSPSSRKEERLRYQD
N.sub_MUSC_459a A I K N R I S H V L K L D V L G M P N T T A K R L P K V P S F L R L R E K Y E N A Q M Q S D S P S S R K E E R L R Y Q D
N.sub_GD_459aa  A I K N R I S H V L K L D V L G M P N T T A K R L P K V P S F L R L R E K Y E N A Q M Q S D S P S S R K E E R L R Y Q D
*****

N.sub_GON_284aa V Q E E Y G Q P E R T Y S F A K E L P A D M D Q Q F P N T I Y F D M Q D S P E K E T N K A L L W V Y I S P D D I I D R N
N.sub_MUSC_459a V Q E E Y G Q P E R T Y S F A K E L P A D M D Q Q F P N T I F F D M Q D S P E K E T N K A L L W V Y I S P D D I I D R N
N.sub_GD_459aa  V Q E E Y G Q P E R T Y S F A K E L P A D M D Q Q F P N T I Y F D M Q D S P E K E T N K A L L W V Y I S P D D I I D R N
*****

N.sub_GON_284aa M T E I Y V Y T I D P P G K F S K V P T K R E I G R R K R H N M K A A G W H H F D I L D E V Q K W T Y R T H L N L G L V
N.sub_MUSC_459a M T E I Y V Y T I D P P G K F S K V P T K R E I G R R K R H N M K A A G W H H F D I L D E V Q K W T Y R T H L N L G L V
N.sub_GD_459aa  M T E I Y V Y T I D P P G K F N K V P T K R E I G R R K R H N M K A A G W H H F D I L D E V Q K W T Y R T H L N L G L V
*****

N.sub_GON_284aa V E A L D E A G N N L V I L P P T F G A D D G Y E P M L D L R T S L R K S T I R S K R S A E L Y C D A R E E T A C C R Y P
N.sub_MUSC_459a V E A L D E A G N N L V I L P P T F G A D D G Y E P M L D L R T S L R K S T I R S K R S A E L Y C D T R E E T A C C R Y P
N.sub_GD_459aa  V E A L D E A G N N L V I L P P T F G A D D G Y E P I L D L R T S L R K S T I R S K R S A E L Y C D T R E E T A C C R Y P
*****

N.sub_GON_284aa L E V D F V A F G W D F V I A P L T Y A A Y Y C A G E C K G E Q L G D T L H A H V I Q Q A P S P T L S Q P Q S A I S N V
N.sub_MUSC_459a L E V D F V A F G W D F V I A P L T Y A A Y Y C A G E C K G E Q L D D T L H A H V I Q Q A P S P T L S Q P Q S A I S N V
N.sub_GD_459aa  L E V D F V A F G W D F V I A P L T Y A A Y Y C A G E C K G E Q L D D T L H A H V I Q Q A P S P T L S Q P Q S A I S N V
*****

N.sub_GON_284aa G P C C T P T K M S D L A M L F F D H N S N I A L T -----
N.sub_MUSC_459a G P C C T P T K M S D L A M L F F D H N S N I A L T R L P R M K V D R C G C A *
N.sub_GD_459aa  G P C C T P T K M S D L A M L F F D H N S N I A L T R L P R M K V D R C G C A *
*****

```

Figura 17.- Alineamiento de la secuencias de la *MSTN* obtenidas de músculo aductor y de glándula digestiva de *Nodipecten subnodosus* de 459 aminoácidos, con la secuencia obtenida de gónada de 284 aminoácidos. Los asteriscos (*) identifican los aminoácidos similares, (:) indican las sustituciones conservadas y (.) indican las sustituciones semi-conservadas entre las tres secuencias. Con (↓) se identifican los nueve residuos de cisteínas conservados. El sitio de procesamiento proteolítico se enmarca con un cuadro.

La amplificación en músculo aductor, glándula digestiva y gónada en dirección 5' con el cebador *MSTN_2-R* y el *UPM* (Clontech), el cual sólo amplificaría en los transcritos con la delección de 157 pb que anteriormente se había identificado, resultó en un fragmento de ~1000 pb (carril 1; Fig. 18a) en músculo aductor y tres fragmentos en gónada, uno de ~1000 pb, un segundo de ~750 pb y un tercero de < 750 pb (carril 3; Fig. 18a); en glándula digestiva no se observó amplificación. La amplificación en dirección 3' de los tres tejidos con el cebador *MSTN_2-F* y el *UPM*, permitió obtener un fragmento de ~ 2000 pb y un segundo fragmento de ~ 300 pb tanto en músculo aductor (carril 1; Fig. 18b) como en gónada (carril 2; Fig. 18b). Sin embargo no se observó amplificación alguna en glándula digestiva.

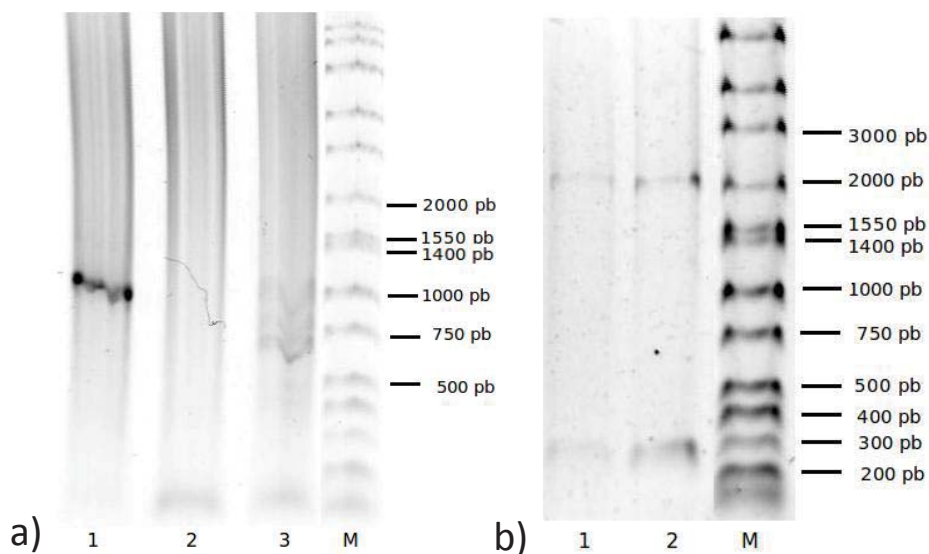


Figura 18. Amplificación con los cebadores *MSTN_2-F* (dirección 3') y *MSTN_2-R* (dirección 5') con ADNc de: a) músculo aductor (carril 1), de glándula digestiva (carril 2) y de gónada (carril 3); marcador de peso molecular (M); y b) de músculo aductor (carril 1) y de gónada (carril 2), marcador de peso molecular (M).

Al realizar la amplificación con los cebadores *MSTN-F* y *UPM* para la amplificación en dirección 3' en glándula digestiva resultó en cuatro fragmentos: el primero de ~ 3000 pb, el segundo de > 1550 pb, el tercero de > 1000 pb y el cuarto > 500 pb (Fig. 19a). La amplificación en glándula digestiva en dirección 5' con los cebadores *RACEMSTN2-R* y *UPM* (Clontech) permitió la obtención de seis fragmentos entre 1400 pb y 500 pb de los cuales fue posible obtener individualmente el fragmento para realizar la secuenciación (Fig. 19b).

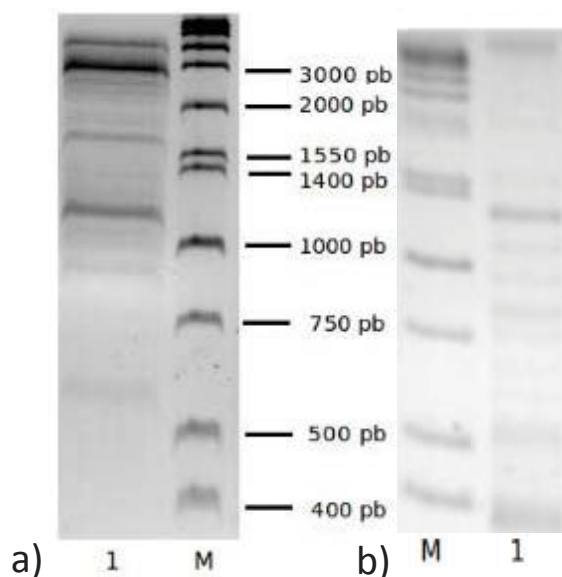


Figura 19. Amplificación con los cebadores *MSTN-F* (dirección 3') y *RACEMSTN2-R* (dirección 5') de ADNc de: a) glándula digestiva (carril 1); marcador de peso molecular (M); y b) glándula digestiva (carril 1); marcador de peso molecular (M).

Las secuencias en dirección 3' resultaron ser inespecíficas. En dirección 5' se obtuvieron tres secuencias de la amplificación. La primera secuencia de 1198 pb, contiene 1167 pb del marco abierto de lectura que codifica para 389 aminoácidos (MSTN_GD_389 aa) a partir del codón de inicio de la secuencia del transcrito completo del gen de la *miostatina*, no presentando la totalidad de la misma debido a la localización del cebador y al hecho de que no se obtuvieron secuencias en la dirección 3' que permitieran obtener un transcrito consenso. La segunda secuencia analizada con ORF Finder presenta un posible cambio de base nucleotídica resultando en un codón de paro en las bases 511-513 y en una secuencia proteica trunca (MSTN_GD_170aa) que contiene solamente parte del dominio TGF-B del propéptido de la *miostatina*. La tercera secuencia (MSTN_GD_149aa) es de 453 pb la cual contiene un marco de lectura que codifica para una proteína de 149 aminoácidos (Fig. 20).

```

MSTN_GD_389aa  MHRLFHPLLF SALFS AVYAGA INQTNETYQMLE QESKELTSIPKHDTLTDDFYDDDYSE
MSTN_GD_170aa  -----
MSTN_GD_149aa  -----

MSTN_GD_389aa  ILPELTLERERNNDVEYDMLNDTTNAT SYYDYE EVEVKNPKHKKQCICRI RDEQKRHRVE
MSTN_GD_170aa  -----DYE EVEVKNPKHKKQCICRI RDEQKRHRVE
MSTN_GD_149aa  -----

MSTN_GD_389aa  AIKNRISHVLKLDVLGMPNTTAKRLPKVPSFLRLREKYENAQM QSDSPSSRKEERLRYQD
MSTN_GD_170aa  AIKNRISHVLKLDVLGMPNTTAKRLPKVPSFLRLREKYENAQM QSDSPSSRKEERLRYQD
MSTN_GD_149aa  -----

MSTN_GD_389aa  VQEEYGQPERTYSFAKELPADMDQQFPNTIYFDMQDSPEKETNKALLWVYISPDDI IDRN
MSTN_GD_170aa  VQEEYGQPERTYSFAKELPADMDQQFPNTIYFDMQDSPEKETNKALLWVYISPDDI IDRN
MSTN_GD_149aa  -----

MSTN_GD_389aa  MTEIYVYITIDPPGKF SKVPTKREIGRRKRHNMKAAAGWHHFDILDEVQKWTYRTHLNLGLV
MSTN_GD_170aa  MTEIYVYITIDPPGKF SKVPT*-----
MSTN_GD_149aa  MTEIYVYITIDPPGKF SKVPTKREIGRRKRHNMKAAAGWHHFDILDEVQKWTYRTHLNLGLV
*****

MSTN_GD_389aa  VEALDEAGNNLVILPPTFGADDGYEPM LDLRTSLRKSTRSKR SAELYCDTREETACCRYP
MSTN_GD_170aa  -----
MSTN_GD_149aa  VEALDEAGNNLVILPPTFGADDGYEPM LDLRTSLRKSTRSKR SAELYCDTREETACCRYP

MSTN_GD_389aa  LEVDFVAFGWDFVIAPLTYAAYCAGECK
MSTN_GD_170aa  -----
MSTN_GD_149aa  LEVDFVAFGWDFVIAPLTYAAYCAGECK

```

Figura 20. Alineamiento de las secuencias de la *MSTN* obtenidas de glándula digestiva de *Nodipecten subnodosus*. Los asteriscos (*) identifican los aminoácidos similares. El sitio de procesamiento proteolítico se enmarca con un cuadro. Al final de la secuencia de 170 aminoácidos se presenta el codón de paro (*).

7.3 Aislamiento y secuenciación del intrón II de la *miostatina* de *N. subnodosus*

La amplificación con los cebadores MSTN-F y qMSTN11-R permitieron la amplificación (Fig. 21) de un fragmento de más de 2000 pb en tres de los organismos utilizados. La secuencia obtenida del intrón II de la *miostatina* de *N. subnodosus* fue de 2013 pb, la cual presenta una similitud con la secuencia del gen de la *miostatina* de *Chlamys farreri* y de *Argopecten irradians* solo en un 30 y

22% de la secuencia respectivamente. El tamaño del mismo intrón en las otras especies es de 1518 pb en *C. farreri* y de 2064 pb en *A. irradians*. Los límites exón/intrón cumplen con la regla GT-AG para el splicing como ya se ha descrito en las otras especies de pectínidos (Hu *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2012) se pueden ver en la figura 22.

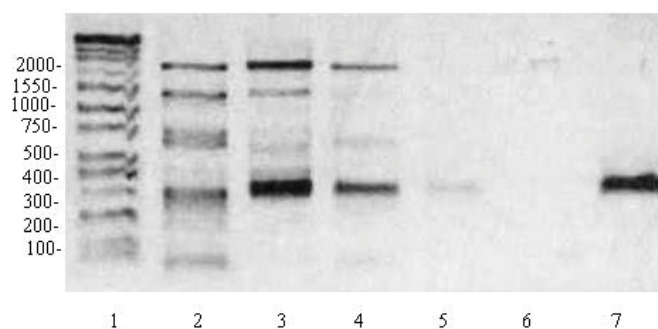


Figura 21. Electroforesis de la amplificación de ADN genómico de músculo aductor de *N. subnodosus*. Orden de muestras 1) Marcador, 2 al 5) individuo 1-4, 6) control negativo, 7) ADNc de músculo aductor como control positivo.

```

1172 tacttccccgcagctttggagctgatgatggata57AAGTCATTTTATTATTCTACATAAAAAAGTAATAACAAAGCCATAATTCATC 53
313 I L P P T F G A D D G Y
AGGCTTAATGAACACCTTATTTTCTCCGAGAAAAACACACTGTCAGTACATCCAAAGCCAAAACCTATTCCCTCCTTGTATCGCGTTA 142
ATAACTTTATGTCCATAAAACAAATTTACGCCATCGACATTAATCGTTTTTAAATGATAATGATGCGTAAACAAATATAGTCATTCAGG 231
TAGTACGTTTACATACATATCTGTCTGTTATCAGTGTTCATATGCCATTTAAACAAAGTGGTTTATGACTACAGGCCTTAACAGCGGAG 320
CAGTTACATACATTACCTGAGGCCAACCTTGTGTAATTGTGTCAAAACTATGACAATTCGTGATTCCTTGACGCAAGAAACTGACGCC 409
AAAAATAAAAAGCCATAAGAGTCAAAATAGCGGTATTTAGGTTTCAATGCTTGTGTTTTATGATAACCATTTAAAGGAATTAATGATGC 498
GATATATGGAATATTGAATTCATTTTCACTTGAGATAAATAATATTCGTCACATAATTCCTTTTTTACCAGAAATCGATGCTCTCAAGACA 587
GATTGTTTTCAAAAATCGTTTTTATATGTAAGAGAACCCTCGCACAAAGTCTATCCGAACCATATCTAGCATGTTATGTAGCACTTC 676
AAACACTATGATAAAAAACAGCAGTTGCATTAATACATTTGACTGATATCATACTTGTAGCAAAAGGCTGGAAGTAGTTTTGATTGGA 765
TGATATACACAAGTTTTCTATTTTGTATTTGAATCAGGGTGAATGGAATCATTATTCGATGGATAATTTCCCTTGGTCAAAAAGCTGA 854
AATAACAAATACGTATGACGATTCCTGTTTTGATGAGGGTGAATGACGAAACAATCACGTGATCTTTATCTTCGATATTTTTCTATAAA 943
ACTGTAATAAAAACCAATTTCTCGGCTAAAATGGTAGTGTATACCTGAAGTTACCTGACTCAACTAAGATAATCAGATCATCAAGAACC 1032
ACTGGTTTATAACTGAATATATATCTATAATTATAGACATTTGGTCTTGAAGACGAGATTTGTTAACTGTAGAATAAGGATTCATGTAG 1121
CAATAGTACGCAATAGATTTAAGGTTTTGCATAATATCCCATATTTCTGATGGGCTTTGTTGTCGTCAAAATAAACTTAAACGGCC 1210
TATTCAAAATCAAAGGAGCGTATCATGATATGAAATATCCGCTCGAGCGACATACGTAGATGATATTAACCGTTTTTAACTACCTTTG 1299
TCCCATCTAGTAATTGCATTAAGTATATTACGACAGGTGTGAAAATGCCTCGTCAGTGTCTTATATATAACCTCCATACACAACACA 1388
GCTGGAACAAAATACACCCTTCAGTTCGTAACCAATCAAATATAATTCAAAGAGCAAACAATCGGCAATGGAATAAAAAGTAGGT 1477
CATGGGGTTAAATATGTTACTTGTAAAACAAAATAAAACTGGTGTGTTGGCATAATGGTTGCACCTACACATCCCTAGCGATACATGTAC 1566
TTGACTAATAACACTTACCTTGTAACTCAGATAATAGCCTTTCAGATATAGGAACATTATAATTGAAATGCATTGACTAATCCGACGCT 1655
TCAACAGTAGAGATCTGCTCAGCTGTGTTGCTTAATATGTTGTTATTCACACCTGGTGAACAGGTGTGCTATGACGAAATGATGACA 1744
TAGAAATTTGATCCCAAGGAAGATGGTAATTGACACGACGTAATGAAATATATGCTTCCCTGACAAACAAACGAGAAATAGAAAGTTTAAA 1833
TTAGTAAACAAAATAAATAATATGTTGGGTTTTTTTTATTTCATTTTATTAATAATCTTTTTTATATCAATTTTTTACTAACTTTACAT 1922
TCTATTTGTGTTGTACCGAAGACAATCGTCAATAATGTAACACTTCTGTTTTATACAACCCATTATCAATTTACATATTTTATATT 2011
1208 TGACccaatgctggatttgcgcacatctotaaggaa 2013
326 E P M L D L R T S L R K

```

Figura 22. Secuencia obtenida de la amplificación del ADN genómico de músculo aductor de *N. subnodosus*, flanqueada por el 2º y 3er exón en letras minúsculas subrayadas. En itálicas se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a las secuencias de cada exón mostradas. Los recuadros presentan los límites del exón/intrón.

7.4 Estructura del péptido maduro de la proteína *miostatina* de *N. subnodosus*

La estructura tridimensional del péptido maduro de la *miostatina* de *N. subnodosus* muestra la estructura general de los TGF- β (Lin *et al.*, 2006) la cual se describe como una mano de cuatro dígitos. Las dos laminas- β antiparalelas formando una superficie aplanada alejada de la hélice α se muestran en la estructura secundaria de la *miostatina* de *N. subnodosus*, GDF-8 de humano y la mioglianina de *D. melanogaster* (Fig. 23). La estructura de GDF-8 de ratón se utilizó para predecir las estructuras de las proteínas con SWISS-MODEL Workspace (Cash *et al.*, 2009; structure 3hh2 at PDB, <http://dx.doi.org/10.2210/pdb3hh3/pdb>).

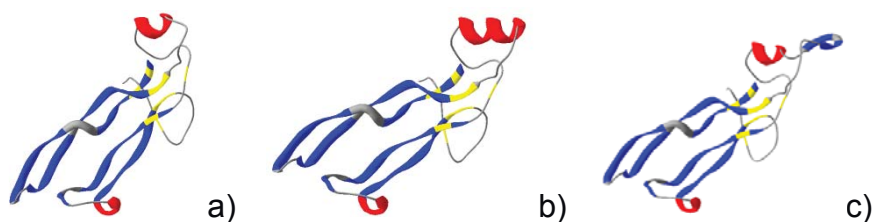


Figura 23. Representación gráfica de la estructura secundaria de las proteínas de: a) Mioglianina de *D. melanogaster*, b) GDF-8 de *Homo sapiens*, y c) *Miostatina* de *N. subnodosus*. Las hélices alfa están de color rojo, las laminas β en azul, los giros β en color gris y los residuos de cisteína en amarillo.

7.5 Análisis filogenético de la MSTN de *N. subnodosus* y alineamiento con proteínas homólogas.

El análisis filogenético realizado para corroborar la relación de la *miostatina* de *N. subnodosus* con otros miembros de la superfamilia de los TGF- β es presentada en la Figura 24. El análisis filogenético muestra que la *miostatina* de *N. subnodosus* fue ubicada en el clado de la MSTN/GDF-11/MYO, donde se presentan tres ramas: la primera agrupando a todos los moluscos bivalvos, la segunda agrupando a la Mioglianina de las especies de *Drosophila* y la tercera agrupando a las MSTN/GDF-11 de los crustáceos (cangrejos, langosta y camarones). En un diferente nodo, un grupo hermano de MSTN/GDF-11/MYO tiene una rama que incluye a GDF-2 del molusco bivalvo *Crassostrea gigas*, una segunda rama que incluye a BMP-2/7 de insectos y una tercera rama con la proteína MAVERICK de *Drosophila spp.* Las proteínas GBB de *Drosophila spp.* y las proteínas DPP de insectos se agruparon en un diferente nodo al que contenía MSTN/GDF-11/MYO, GDF-2, BMP-2/7 y MAVERICK. En un diferente nodo a los ya mencionados se encuentran agrupadas las proteínas Inhibinas de insectos, con la proteína GDNF de *Mus musculus* incluida como outgroup dando lugar a este último nodo y al que da lugar a todos los anteriores.

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la MSTN de *N. subnodosus*, MSTN/GDF-11 de moluscos y crustáceos, y de la Mioglianina de *Drosophila spp.* se presenta en la figura 25. La posición del sitio de procesamiento proteolítico

(RXXR) que representa el presunto sitio de escisión de la proteína madura, se mantiene conservado entre las especies de MSTN/GDF-11 de moluscos y de las Mioglininas de *Drosophila spp.* Este sitio se encuentra 6 aminoácidos hacia arriba de la primer cisteína en la región conservada de la proteína de MSTN/GDF-11/MYO, y a la izquierda de una serina conservada en todas las especies. En las especies de crustáceos el sitio de procesamiento proteolítico de MSTN/GDF-11 también está conservado, aunque en estas especies está localizado 7 aminoácidos hacia arriba de la primera cisteína conservada, dos aminoácidos a la izquierda de la serina conservada donde se puede observar una asparagina insertada a la izquierda de la serina conservada.

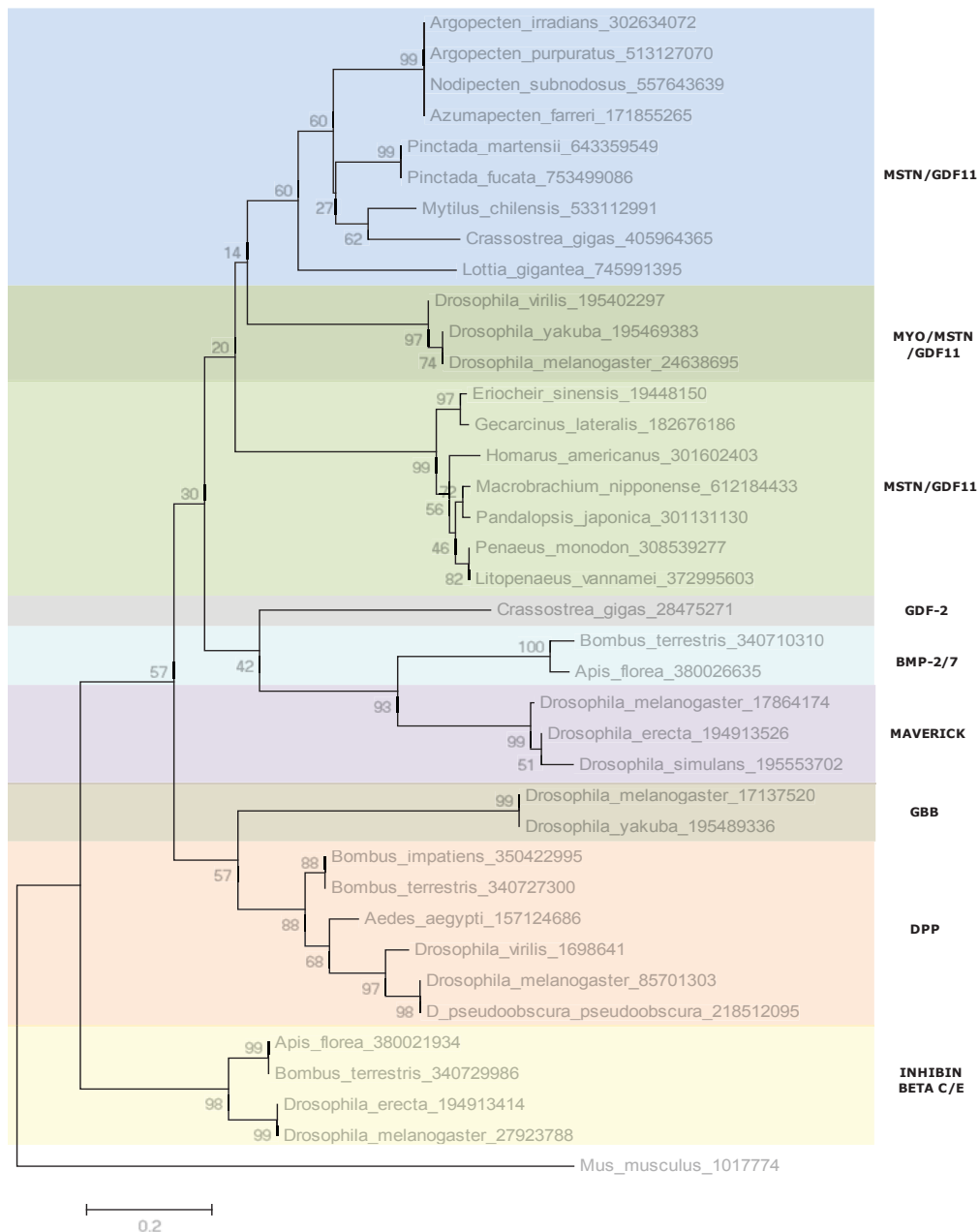


Figura 24. Árbol filogenético de la MSTN de *Nodipecten subnodosus* realizado con MEGA 6.0, basado en la secuencia conservada de aminoácidos de varios invertebrados. El árbol fue construido usando el algoritmo de Neighbor-joining, con 10,000 repeticiones y el modelo WAG. Las filogenias fueron enraizadas con la proteína GDNF. Las subfamilias de proteínas están separadas por colores. La MSTN está marcada en azul, donde se encuentra agrupada la MSTN de *N. subnodosus*. Los nombres de las secuencias incluyen el número GI (Geninfo) de NCBI.

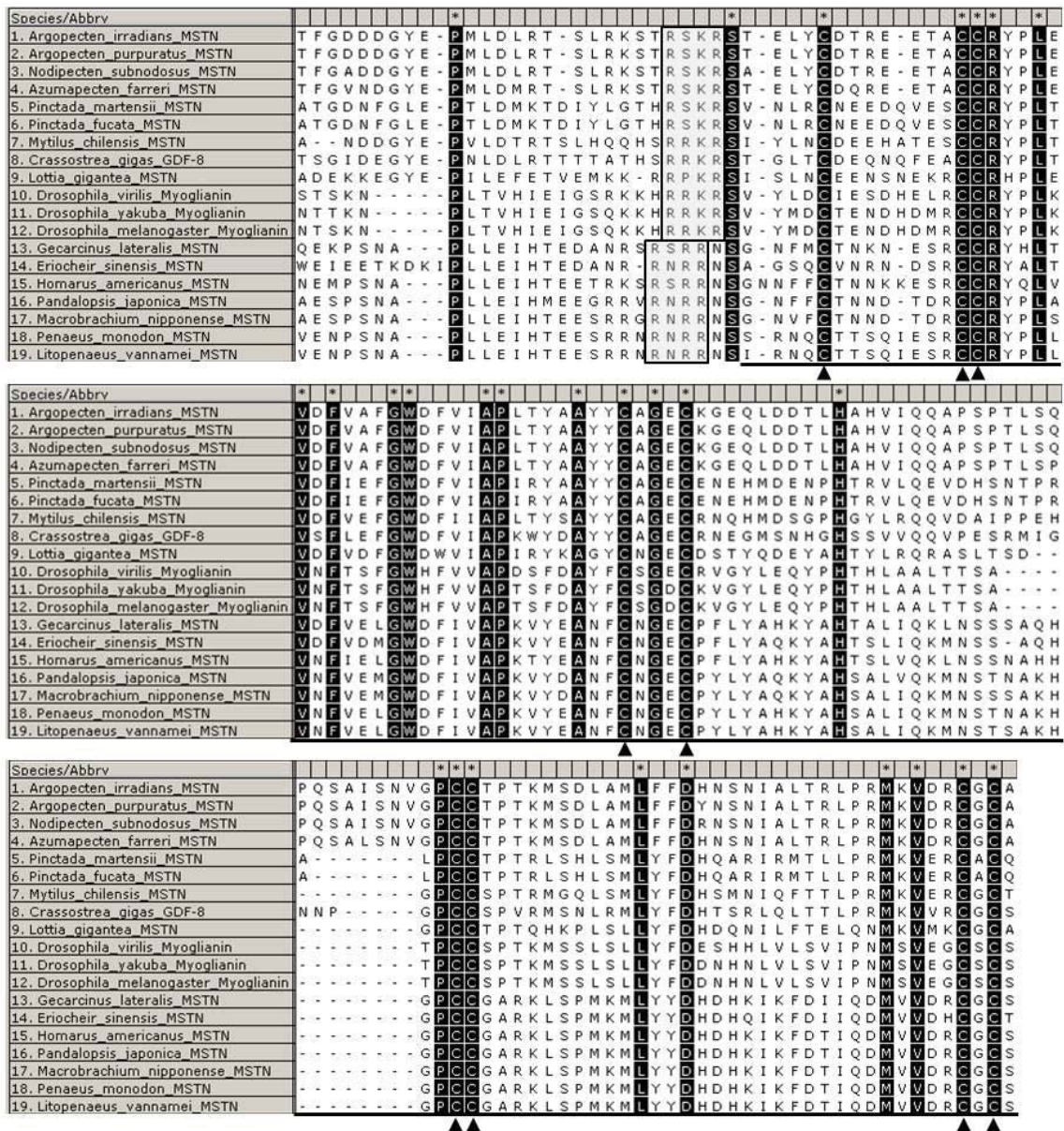


Figura 25. Alineamiento de proteínas homólogas/ortólogas de la MSTN/GDF-11 y Mioglianina. Los aminoácidos idénticos y conservados están marcados con (*). Los recuadros en gris muestran el sitio de procesamiento proteolítico (RXR). Los triángulos indican las nueve cisteínas presentes en todas las *miostatinas* miembros de la familia de TGF-β, y el dominio C-terminal altamente conservado se encuentra subrayado.

7.6 Cuantificación por PCR en tiempo real (qPCR) de los diferentes transcritos de la miostatina en músculo aductor de *N. subnodosus* durante un ciclo anual de crecimiento en un sitio de baja productividad y determinación de su ubicuidad

7.6.1 Variables ambientales y crecimiento durante el ciclo anual evaluado

El incremento en el peso de la biomasa y del músculo aductor se muestran en la figura 26 (A y B). Las variables ambientales como la temperatura y la clorofila-a que se registraron durante el período de crecimiento evaluado se presentan en la figura 26 (C). El incremento en peso de la biomasa y del músculo aductor, presentaron diferencias significativas entre meses ($P < 0.05$). Se observa un decremento del peso de la biomasa del mes de mayo a septiembre del 2008, con un subsecuente incremento de peso de diciembre del 2008 hasta junio del 2009. En músculo aductor se observa un incremento de peso del mes de julio del 2008 hasta junio del 2009. Tanto en la biomasa como en el músculo aductor se presenta un decremento significativo en el peso del mes de junio a agosto del 2009. En las variables ambientales se observó una relación negativa entre la temperatura y la clorofila-a durante el periodo de crecimiento. Cuando se presentaron altas temperaturas en los meses de julio y septiembre del 2008 así como en junio y agosto del 2009, se observaron las menores concentraciones de clorofila-a. Por el contrario, al presentarse bajas temperaturas se observó un incremento en la concentración de clorofila-a.

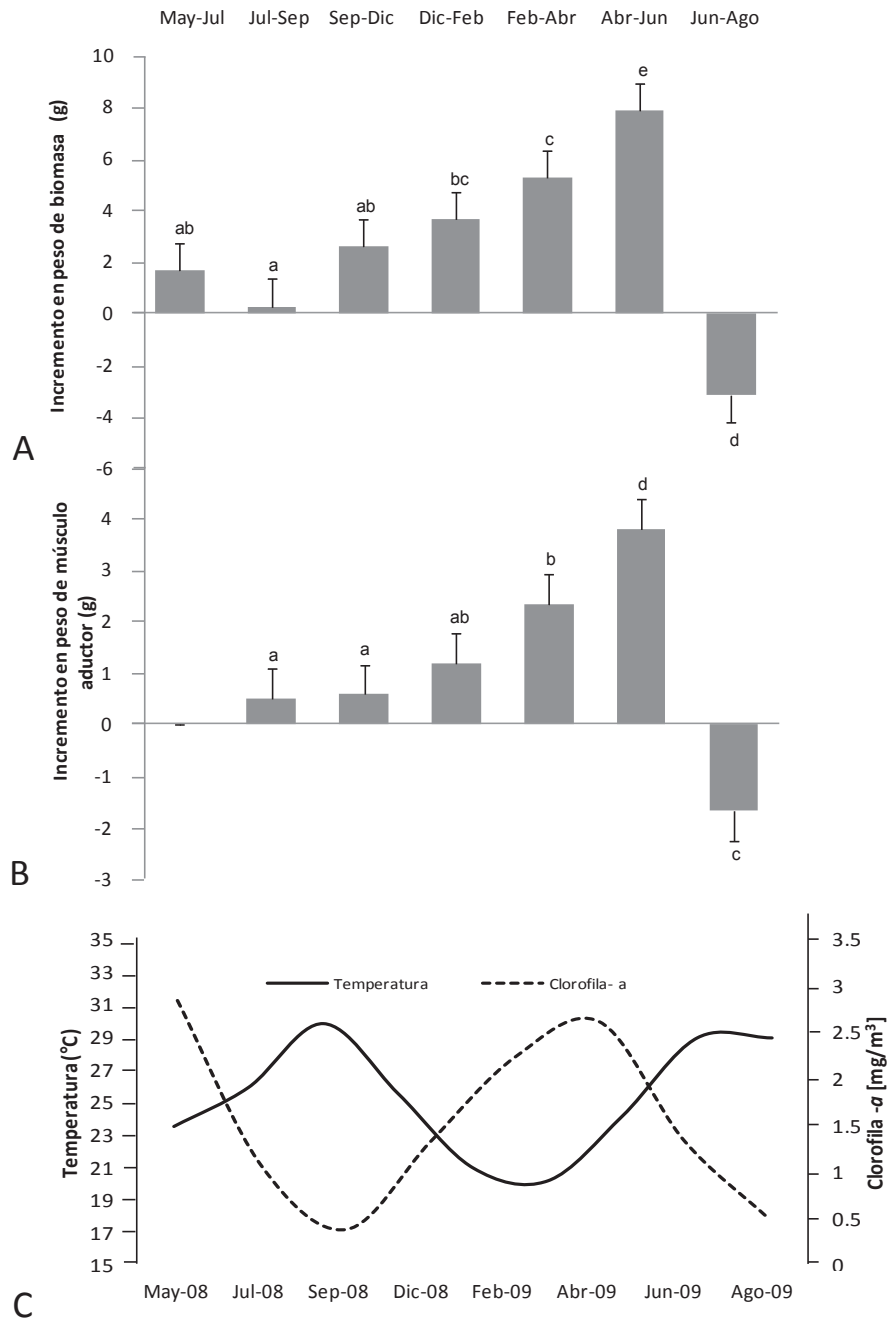


Figura 26. Incremento en el peso observado en *Nodipecten subnodosus* durante el crecimiento. Incremento en el peso de la biomasa (A) fue estimado a partir de mayo 2008 a agosto de 2009, el incremento en el peso del músculo aductor (B) fue estimado de julio de 2008 a agosto de 2009. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias y los intervalos de confianza. La temperatura y la concentración de clorofila-a durante el periodo de crecimiento se muestran en la figura (C).

7.6.2 Estabilidad de genes de referencia para la normalización de la expresión del gen de la *miostatina* en músculo aductor de *N. subnodosus* en un ciclo de crecimiento en un sitio de baja productividad

Diferentes genes de referencia fueron encontrados como los más estables para el análisis de la expresión de la *miostatina* en *N. subnodosus*: *ef-1 α* y *α -tub* fueron los genes más estables para la normalización de la expresión de la *miostatina* en músculo aductor evaluada durante un periodo de crecimiento (Fig. 27) obteniendo el mejor promedio según el programa *RefFinder*. Mientras que los más estables para la normalización de la expresión de la *miostatina* evaluada entre tejidos en el mes de Agosto-2009 fueron *18S* y *rpl8* (Fig. 28).

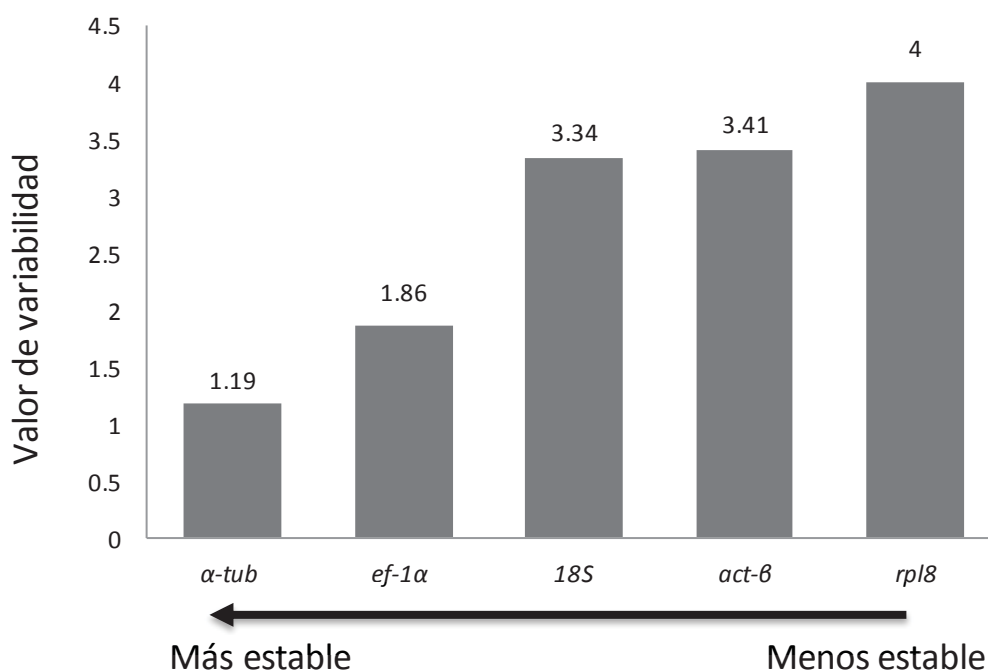


Figura 27. Estabilidad de los genes de referencia estimada con RefFinder con base en los métodos Delta Ct, Bestkeeper, NormFinder y GeNorm. Los genes más estables fueron utilizados para la normalización de la cuantificación de la expresión del gen de la *miostatina* de *N. subnodosus* en músculo aductor durante un ciclo de crecimiento.

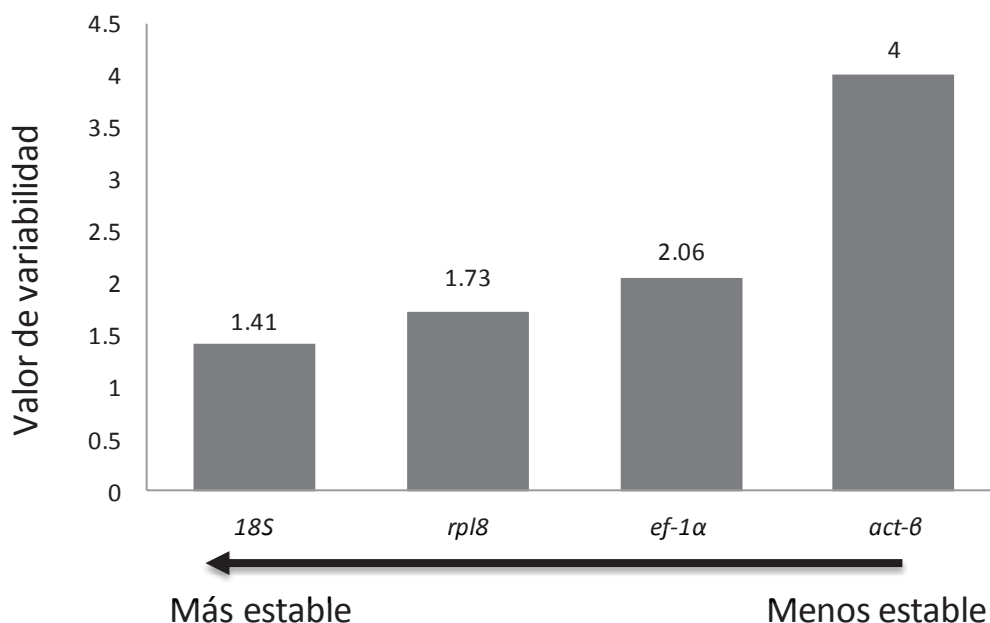


Figura 28. Estabilidad de los genes de referencia estimada con RefFinder con base en los métodos Delta Ct, Bestkeeper, NormFinder y GeNorm. Los genes más estables fueron utilizados para la normalización de la cuantificación de la expresión del gen de la *miostatina* de *N. subnodosus* en músculo aductor, manto, branquia, glándula digestiva y gónada para determinación de ubicuidad.

7.6.3 Cuantificación de la expresión del gen de la *miostatina* en la almeja mano de león *N. subnodosus* en un ciclo de crecimiento en un sitio de baja productividad

La expresión temporal de la *miostatina* en músculo aductor de *N. subnodosus* analizada durante un ciclo de crecimiento es mostrada en las Fig. 29 y la Fig. 31. La expresión de la *miostatina* analizada con el par de cebadores qMSTN_1 F y R (ver sección 6.2.6 de Materiales y Métodos) (Fig. 29) fue significativamente diferente entre meses ($P < 0.05$). La mayor expresión de la *miostatina* fue observada en el mes de agosto-2009, seguida de septiembre-2008 y junio-2009 sin mostrar diferencias significativas estas dos últimas. La expresión en agosto-2009 muestra diferencias significativas con el periodo de septiembre-2008 hasta abril-2009, observándose los niveles más bajos de expresión en los meses de diciembre-2008 y febrero-2009. Durante el primer año de crecimiento en Julio-2008 y Septiembre-2008 se observaron altos niveles de expresión. La expresión de la *miostatina* en tejidos de *N. subnodosus* muestreados en el mes de Agosto-

2009 amplificada con los mismos cebadores que en músculo durante el crecimiento fue observada en los cinco tejidos (Fig. 30), pero con diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($P < 0.05$). La expresión más alta fue observada en músculo aductor seguida de manto y branquias sin diferencias significativas. La menor expresión se observó en glándula digestiva y gónada consecutivamente mostrando diferencias significativas con la expresión en músculo aductor.

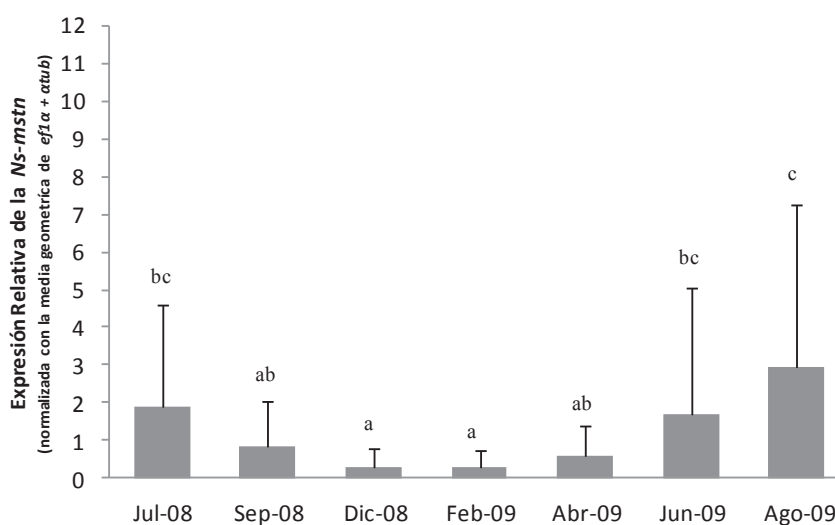


Figura 29. Expresión relativa de la *miostatina* (retransformada de logaritmos) en músculo aductor de *N. subnodosus* durante su crecimiento (Julio-2008 a Agosto-2009). La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_1-F y R. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza.

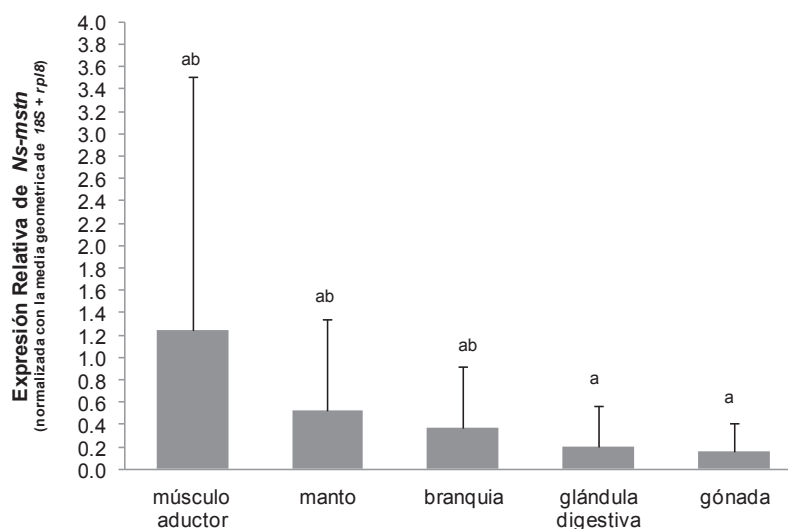


Figura 30. Expresión relativa de la *miostatina* (retransformada de logaritmos) en cinco tejidos de la almeja mano de león muestreadas en Agosto-2009. La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_1-F y R. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza.

La expresión de la *miostatina* analizada con el par de cebadores qMSTN_2 F y R (ver sección 6.2.6 de Materiales y Métodos) (Fig. 31) fue significativamente diferente entre meses ($P < 0.05$). La mayor expresión de la *miostatina* analizada con este par de cebadores fue observada en el mes de junio-2009, mostrando diferencias significativas únicamente con el mes de febrero-2008. La *miostatina* muestra el mismo patrón de expresión que el mostrado con los cebadores qMSTN_1, la mayor expresión se muestra en los meses de agosto y junio-2009, y el mes de julio-2008, mientras que la menor expresión se observa en el mes de febrero-2009 con diferencias significativas. La expresión de la *miostatina* en los tejidos muestreados en el mes de agosto-2009, al igual que con el cebador qMSTN_1 se observa en los cinco tejidos (Fig. 32) con diferencias significativas entre ellos ($P < 0.05$). El patrón de expresión es el ya observado, la mayor expresión en músculo aductor seguido de manto y branquia sin diferencias significativas, mientras que menor expresión se observa en gónada, seguida de glándula digestiva, con diferencias significativas con el músculo aductor.

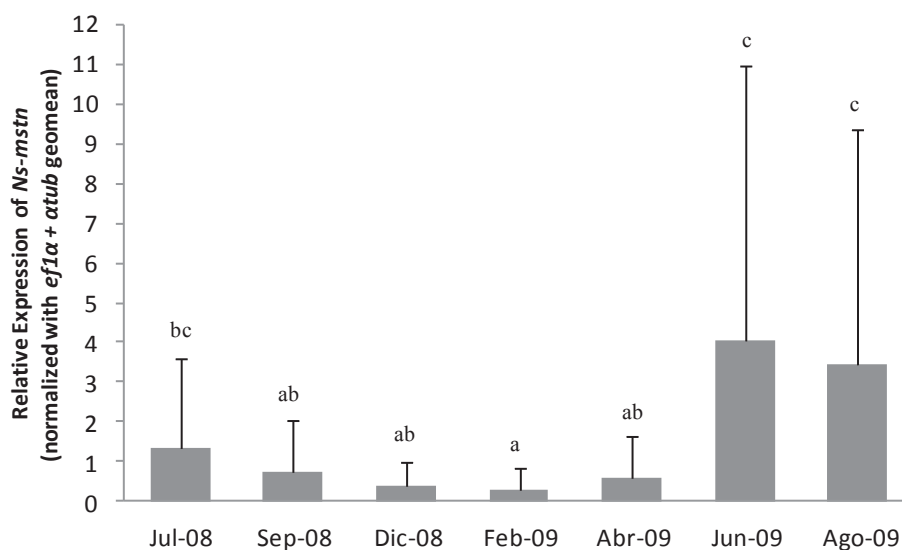


Figura 31. Expresión relativa de la *miostatina* (retransformada de logaritmos) en músculo aductor de *N. subnodosus* durante su crecimiento (Julio-2008 a Agosto-2009). La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_2-F y R. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza.

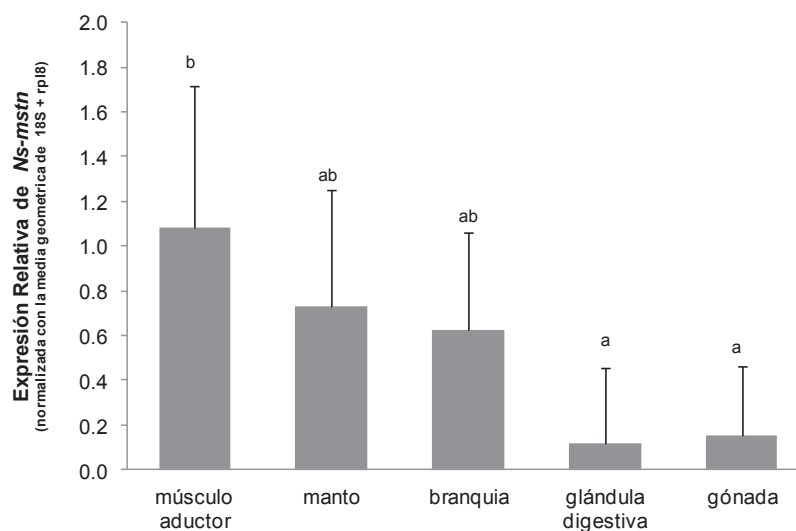


Figura 32. Expresión relativa de la *miostatina* (retransformada de logaritmos) en cinco tejidos de la almeja mano de león muestreadas en Agosto-2009. La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_2-F y R. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan la media con los intervalos de confianza.

7.7 Rutas metabólicas afectadas en músculo aductor de *N. subnodosus* por condiciones experimentales de estrés nutricional

7.7.1 Identificación de rutas metabólicas afectadas en músculo aductor de organismos sometidos a estrés alimenticio.

Del experimento en *swap* realizado en un microarreglo de *Drosophila melanogaster* hibridado con ADNc de músculo aductor se obtuvieron los genes diferencialmente expresados. Se encontraron un total de 866 genes sobre-regulados (Z-score > 1.5) y 912 genes sub-regulados (Z-score < -1.5). El análisis realizado con KEGG Mapper revela que del total de los genes diferencialmente expresados estos participan en un total de 45 vías de señalización diferentes (Tabla III). Estas vías de señalización que están anotadas en la base de datos de KEGG, forman parte de las principales vías metabólicas como son: el metabolismo de los carbohidratos, metabolismo de los ácidos grasos que incluye la beta oxidación, el metabolismo de los lípidos y la oxidación fosforilativa principalmente. En la figura 33, se puede observar el mapa metabólico obtenido con KEGG Mapper en donde se pueden identificar en que vía de señalización están involucrados los genes sobre regulados (color azul) y sub-regulados (color rojo) dentro de cada vía metabólica principal. PANTHER Classification System fue usado para detectar grupos con base en términos ontológicos. Únicamente se determinaron grupos para procesos biológicos. Los procesos biológicos con un mayor número de genes sobre y sub-regulados son los procesos metabólicos (Fig. 34, inciso A) con 123 genes sobre expresados y 110 sub expresados. El grupo dentro de procesos metabólicos que presenta un mayor número de genes (Fig. 34, inciso B) son los procesos metabólicos primarios con el mayor número de genes afectados (104 sobre expresados y 90 sub expresados). Estos grupos permitieron conocer que los procesos metabólicos más afectados son los relacionados con las proteínas, seguido de los relacionados con compuestos de nucleobases (ADN/ARN), lípidos, aminoácidos y finalmente los carbohidratos (Fig. 35).

Tabla III. Vías metabólicas identificadas con KEGG mapper en los que se encuentran involucrados los genes diferencialmente expresados identificados con el microarreglo heterólogo de *D. melanogaster* hibridado con ADNc de músculo aductor de organismos de *N. subnodosus* experimentalmente expuestos a estrés nutricional.

KEGG pathway	Nombre de la vía metabólica	# de genes
dme00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P45	57
dme00982	Drug metabolism - cytochrome P450	57
dme00190	Oxidative phosphorylation	42
dme00480	Glutathione metabolism	38
dme00500	Starch and sucrose metabolism	36
dme00040	Pentose and glucuronate interconversion	32
dme01130	Pentose and glucuronate interconversions	30
dme03008	Ribosome biogenesis in eukaryotes	30
dme04145	Phagosome	30
dme04310	Wnt signaling pathway	30
dme04142	Lysosome	29
dme00983	Drug metabolism - other enzymes	28
dme00860	Porphyrin and chlorophyll metabolism	27
dme00330	Arginine and proline metabolism	27
dme01200	Carbon metabolism	27
dme00830	Retinol metabolism	26
dme03015	mRNA surveillance pathway	26
dme04146	Peroxisome	25
dme04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	25
dme00053	Ascorbate and aldarate metabolism	25
dme03013	RNA transport	24
dme03010	Ribosome	22
dme00052	Galactose metabolism	21
dme00561	Glycerolipid metabolism	20
dme01212	Fatty acid metabolism	17
dme03040	Spliceosome	17
dme00230	Purine metabolism	17
dme04080	Neuroactive ligand-receptor interaction	17
dme00240	Pyrimidine metabolism	16
dme00512	Mucin type O-Glycan biosynthesis	15
dme00564	Glycerophospholipid metabolism	15
dme04120	Ubiquitin mediated proteolysis	15
dme00600	Sphingolipid metabolism	14
dme04144	Endocytosis	14
dme01230	Biosynthesis of amino acids	14
dme00910	Nitrogen metabolism	14
dme01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	13
dme04068	FoxO signaling pathway	13
dme00051	Fructose and mannose metabolism	12
dme04745	Phototransduction	11
dme00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	11
dme04391	Hippo signaling pathway	11
dme03050	Proteasome	10
dme00071	Fatty acid degradation	10
dme00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	10

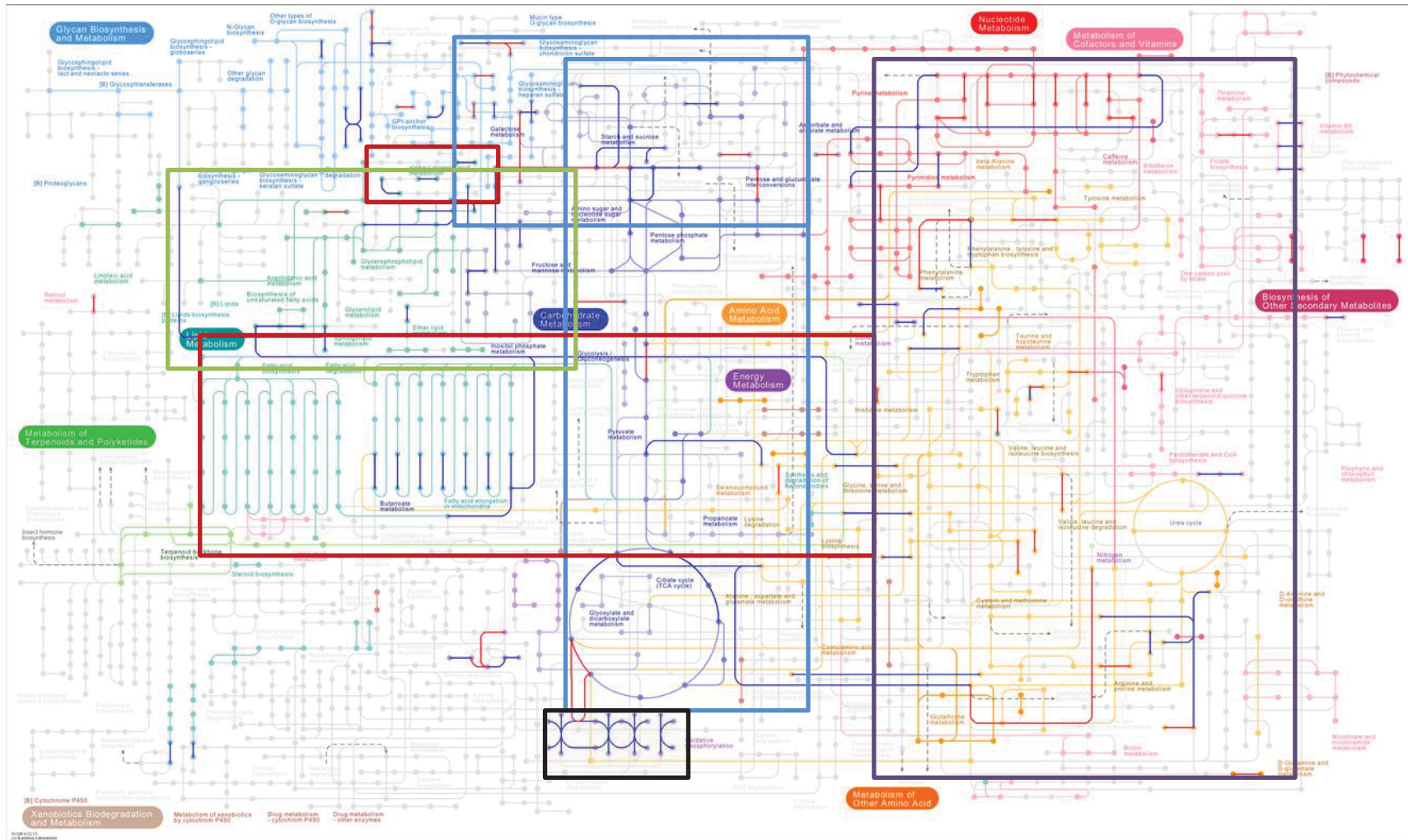


Figura 33. Mapa metabólico de las vías de señalización donde están involucrados los genes sobre-regulados (azul) y sub-regulados (rojo) identificados con el microarreglo heterólogo de *D. melanogaster* hibridado con ADNc de músculo aductor de organismos de *N. subnodosus* sometidos experimentalmente a estrés alimenticio. Las vías de señalización se muestran en diferente color: en verde el metabolismo de lípidos, en rojo el metabolismo de los ácidos grasos, en amarillo la beta oxidación, en azul el metabolismo de los carbohidratos, en negro la oxidación fosforilativa y en morado el metabolismo de los aminoácidos y nucleótidos.

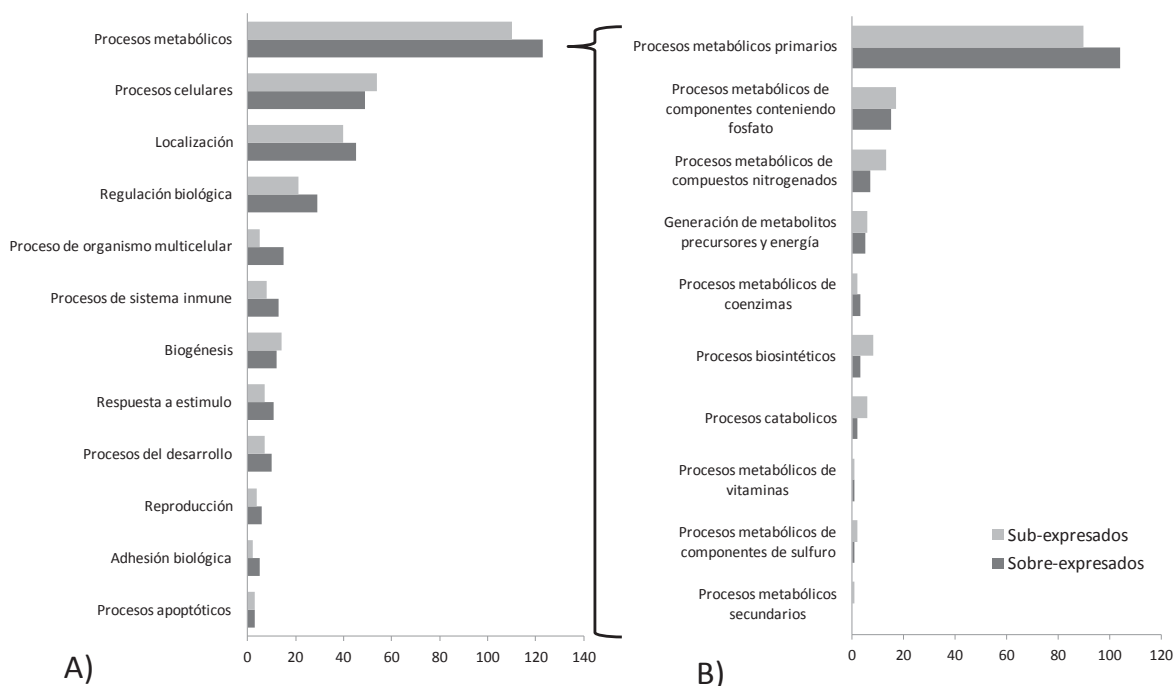


Figura 34. Procesos biológicos con base en términos ontológicos agrupados con el Sistema de Clasificación PANTHER. (A) Primer nivel de categorización de los procesos biológicos y (B) Categorización de los procesos metabólicos. Barras gris claro muestran los genes sub expresados y las barras gris oscuro los genes sobre expresados.

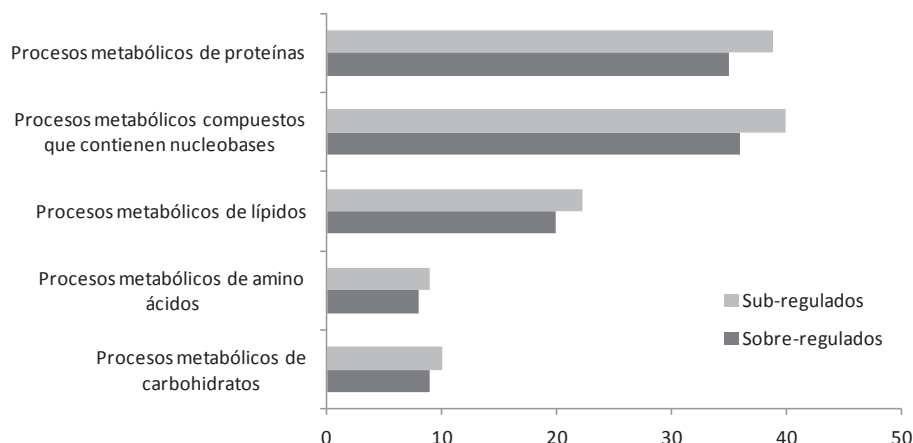


Figura 35. Procesos metabólicos primarios agrupados por PANTHER Classification System dentro procesos metabólicos. Barras gris claro muestran los genes sub expresados y las barras gris oscuro los genes sobre expresados.

Los procesos biológicos identificados con el análisis de enriquecimiento con términos ontológicos realizado con WebGestalt, mediante una prueba hipergeométrica ($P > 0.05$) en los genes sobre-expresados fueron: *Transporte transmembrana*, *Procesos metabólicos de carbohidratos*, *Procesos metabólicos de lípidos* y *Señal de transducción de proteína-Rab*. En los genes sub-expresados, los procesos biológicos con una $P > 0.05$ fueron: *Procesamiento de ARNt* y *Morfogenesis Notum* (Tabla IV). El análisis de enriquecimiento con base en la base de datos de KEGG para identificar cuáles son las rutas metabólicas significativamente representadas en los genes diferencialmente expresados en el microarreglo se muestran en la tabla V. Este análisis arroja que de manera general al analizar los genes sobre-regulados las *Rutas metabólicas* (Metabolic pathways) ($P < 0.05$) fueron afectadas en el músculo aductor por la exposición a estrés alimenticio de los organismos de *N. subnodosus*. En los genes sub-regulados, el análisis identifica a la ruta de *Proteólisis mediada por Ubiquitina* es la más afectada pero sin diferencias significativas ($P > 0.05$). Al realizar el mismo análisis pero integrando los genes diferencialmente expresados en el microarreglo (sobre- y sub-regulados), los resultados arrojaron que las rutas metabólicas donde se involucran los Peroxisomas están significativamente afectadas ($P < 0.05$) con nueve genes.

Tabla IV. Procesos biológicos identificados por términos ontológicos con WebGestalt

Término	Proceso biológico	P-value	# genes
<i>Sobre expresados</i>			
GO:0055085	Transporte transmembrana	7.57E-08	29
GO:0005975	Procesos metabólicos carbohidratos	0.0006	14
GO:0006629	Procesos metabólicos de lípidos	0.0015	15
GO:0032482	Señal de transducción de proteína Rab	0.0017	4
<i>Sub expresados</i>			
GO:0008033	Procesamiento de ARNt	0.0007	5
GO:0048802	Morfogénesis notum	0.0025	2

Tabla V. Rutas metabólicas identificadas con base en la base de datos KEGG con WebGestalt

Ruta KEGG	Proceso biológico	P-value	# genes
<i>Sobre expresados</i>			
1100	Rutas metabólicas	9.39e-05	32
<i>Sub expresados</i>			
4120	Proteólisis mediada por Ubiquitina	0.5616	3
<i>Sobre y Sub-expresados</i>			
4146	Peroxisomas	0.0097	9

Dado que los resultados obtenidos en WebGestalt muestran que los procesos metabólicos de carbohidratos y lípidos, así como los genes relacionados con las rutas de los peroxisomas, son los procesos biológicos que presentan significancia estadística al someter a los organismos a estrés alimenticio, con base en las herramientas utilizadas en el presente trabajo se realizó la identificación de los genes dentro de cada una de las rutas metabólicas antes mencionadas (Tablas VI, VII y VIII).

Tabla VI. Genes diferencialmente expresados dentro de los Procesos Metabólicos de Lípidos.

	Nombre de genes identificados	Fold change array
<i>Sobre- expresados</i>		
CG11406	Lipase	1.65
CG9009	<i>puddy</i> (Acyl-CoA synthetase)	1.97
CG11801	Elongation of very long chain fatty acids protein 4	1.71
CG10069	Major Facilitator Superfamily Transporter 16 (Glycerol-3-phosphate transporter)	1.66
CG6437	GlcT-1	1.82
CG8732	Long-chain acyl-CoA synthetase	1.71
CG11600	Lipase (triglyceride lipase activity)	1.92
CG31873	Multi-substrate lipid kinase (acylglycerol kinase)	2.06
CG13401	U26 (Acyl-CoA synthetase)	2.63
CG8112	O-acyltransferase	2.66
CG11426	phosphatidate phosphatase	2.91
CG8805	<i>wunen-2</i> (Phosphatidate phosphatase activity)	2.17
CG4016	Serine palmitoyltransferase subunit I	2.08
<i>Sub- expresados</i>		
CG10120	Malic enzyme	-1.65
CG4162	<i>Lace</i> (serine C-palmitoyltransferase activity)	-1.69
CG9577	Delta (3,5)-Delta (2,4)-Dienoyl-CoA Isomerase, Mitochondrial	-1.75
CG8629	Acyl-CoA-Binding protein Homolog	-2.21
CG18330	CTP:phosphocholine cytidyltransferase 2	-2.41
CG8256	Glycerophosphate oxidase-1	-2.31

Tabla VII. Genes diferencialmente expresados dentro de los Procesos Metabólicos de Carbohidratos.

	Nombre de genes identificados	Fold change array
<i>Sobre- expresados</i>		
CG8475	Phosphorylase B Kinase regulatory subunit beta (Phk)	1.62
CG12582	β -Mannosidase	1.67
CG10749	Malate Dehydrogenase, Mitochondrial	1.63
CG10069	Major Facilitator Superfamily Transporter 16 Glycerol-3-phosphate transporter	1.66
CG7995	Glycerol kinase	1.56
CG7328	Ketohexokinase	1.77
CG4706	Aconitate Hydratase, Mitochondrial	1.64
CG8251	Phosphoglucose isomerase (Glucose-6-phosphate isomerase) (Pgi)	1.51
CG4001	Phosphofructokinase (Pfk)	1.66
CG4649	Sorbitol dehydrogenase-2 (L-iditol 2-dehydrogenase)	2.19
CG11967	Carbonic anhydrase beta	1.79
CG12529	<i>Zwischenferment</i> (glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase)	1.56
CG7995	Glycerol kinase (Gk)	1.56
CG32444	Aldose 1-epimerase	2.43
CG6850	UDP-glucose-glycoprotein glucosyltransferase	2.74
CG9463	Lysosomal α -mannosidase III	2.47
<i>Sub- expresados</i>		
CG12151	Pyruvate dehydrogenase phosphatase	-1.60
CG6666	Succinate dehydrogenase C	-1.66
CG2096	<i>flapwing</i> (fosfoproteína fosfatasa-I (PP1))	-1.64
CG6650	ADP-dependent glucokinase	-2.76
CG17645	Pglym87 (2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase) (Pgm)	-1.52
CG8256	Glycerophosphate oxidase-1 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity)	-2.30
CG5475	p38a MAP kinase	-2.28

Tabla VIII. Genes diferencialmente expresados dentro de los Procesos donde están involucrados los Peroxisomas.

	Nombre de genes identificados	Fold change array
<i>Sobre- expresados</i>		
CG6486	Peroxin 7	1.81
CG12428	Peroxisomal Carnitine O-Octanoyl Transferase	1.95
CG9527	Peroxisomal Acyl-Coenzyme A Oxidase 3	1.67
CG4289	Peroxin 14	1.93
<i>Sobre- expresados</i>		
CG9027	Superoxide dismutase 3	-1.71
CG9577	Delta(3,5)-Delta(2,4)-Dienoyl-CoA Isomerase, Mitochondrial	-1.75
CG10672	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4	-2.33

7.7.2 Estabilidad de genes de referencia para la normalización de la expresión del gen de la miostatina en organismos de Nodipecten subnodosus sometidos experimentalmente a estrés nutricional

Para el análisis de expresión de la *miostatina* en músculo aductor de organismos de *N. subnodosus* sometidos experimentalmente a estrés nutricional, los genes de referencia más estable fueron *ef-1α* y *rpl8*, según el mejor promedio obtenido con el programa RefFinder (Fig. 36).

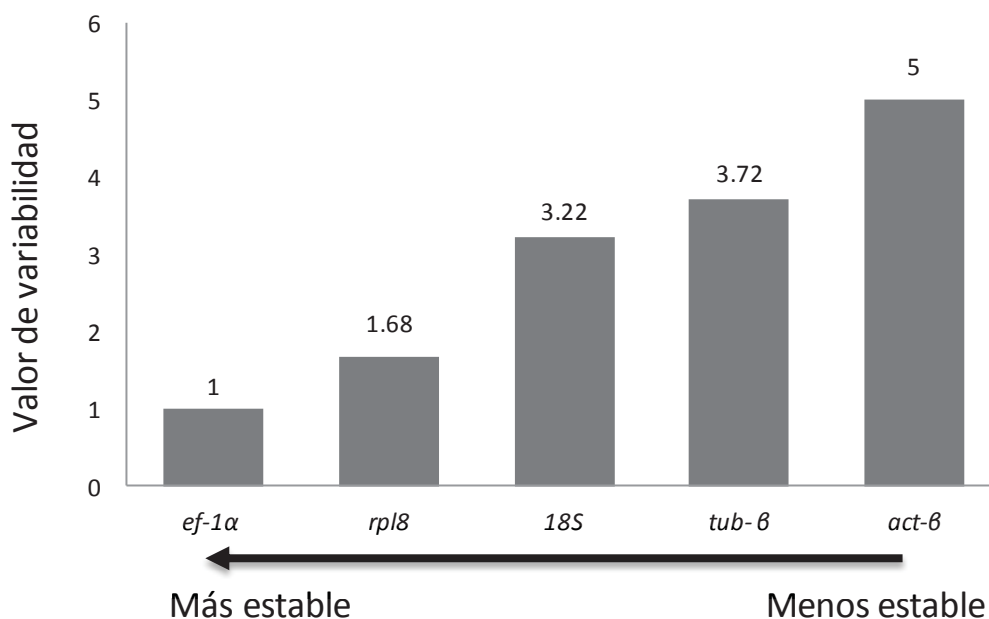


Figura 36. Estabilidad de los genes de referencia estimada con RefFinder con base en los métodos Delta Ct, Bestkeeper, NormFinder y GeNorm. Los genes más estables fueron utilizados para la normalización de la cuantificación de la expresión del gen de la *miostatina* de *N. subnodosus* en músculo aductor de organismos sometidos experimentalmente a estrés nutricional.

7.7.3 Análisis de la expresión diferencial por PCR en tiempo real (qPCR) de la *miostatina* en los organismos de *Nodipecten subnodosus* sometidos a estrés nutricional

La expresión de la *miostatina* en organismos sometidos a estrés nutricional es mostrada en las figuras 37 y 38. La cuantificación realizada con el par de cebadores qMSTN_1-F y R, muestra que en los grupos experimentales de bajo y alto alimento en cada tejido no fueron observadas diferencias significativas ($P > 0.05$), sin embargo si se observaron diferencias significativas entre tejidos ($P < 0.05$) (Fig. 37). La expresión de la *miostatina* en los cinco tejidos de los grupos control y experimental sujetos a diferentes condiciones de alimentación mostraron que los más altos niveles del transcrito se encontraron en músculo aductor del grupo con alto alimento, con tendencia a presentar una mayor expresión que el grupo con bajo alimento pero sin diferencias significativas. La expresión de la *miostatina* en el manto del grupo con bajo alimento mostró niveles intermedios entre el músculo aductor y el resto de los tejidos (manto del grupo de alto alimento, branquias, glándula digestiva y gónada), siendo el

grupo sometido a bajo alimento el que muestra una tendencia a presentar mayor expresión en manto y en branquia que el grupo de alto alimento, sin observarse diferencias significativas en estos tejidos.

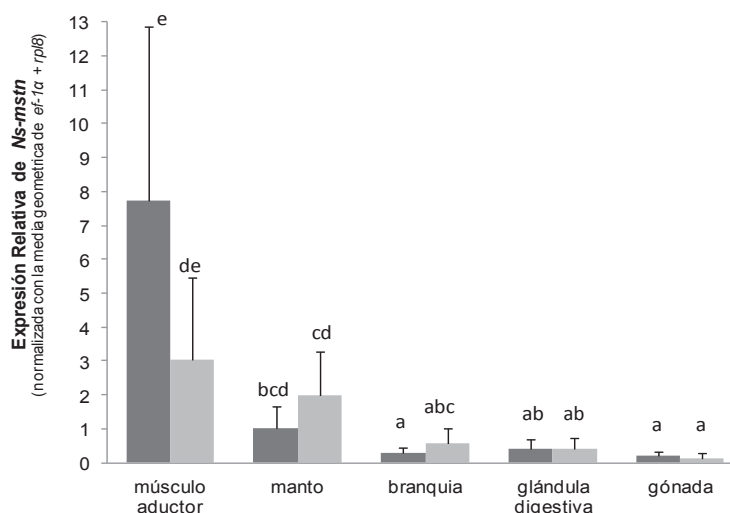


Figura 37. Expresión relativa de la *miostatina* (retransformada de logaritmos) en músculo aductor, manto, branquia, glándula digestiva y gónada de *N. subnodosus* de organismos expuestos a condiciones experimentales de estrés nutricional. La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_1-F y R. Barras gris oscuro grupo de alto alimento y barras gris claro grupo de bajo alimento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza.

La cuantificación de la *miostatina* realizada con el par de cebadores qMSTN_2 F y R en organismos sometidos a estrés nutricional es mostrada en la Fig. 38. Al igual que el análisis con los cebadores qMSTN_1 F y R no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los grupos experimentales de bajo y alto alimento en cada tejido. La mayor expresión se observa en músculo aductor del grupo sometido a alto alimento, seguido de gónada sometido a bajo alimento pero sin presentar diferencias significativas. La menor expresión se observa en manto para el grupo de alto alimento seguido de branquia y glándula digestiva, presentando diferencias significativas ($P < 0.05$) con el resto de los tejidos. En los tejidos manto, branquia, glándula digestiva así como en gónada aunque no se presentan diferencias significativas se puede observar

una tendencia a una mayor expresión en el grupo de bajo alimento que en el grupo de alto alimento.

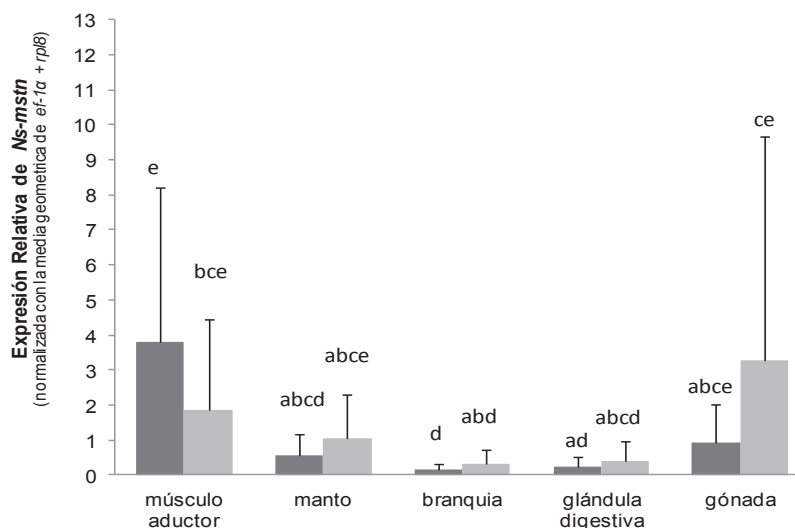


Figura 38. Expresión relativa de la *miostatina* (retransformada de logaritmos) en músculo aductor, manto, branquia, glándula digestiva y gónada de *N. subnodosus* de organismos expuestos a condiciones experimentales de estrés nutricional. La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_2-F y R. Barras gris oscuro grupo de alto alimento y barras gris claro grupo de bajo alimento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza.

7.8 Análisis de la expresión de la *miostatina* por PCR cuantitativo (qPCR) en glándula digestiva, manto y músculo aductor de organismos de *Nodipecten subnodosus* experimentalmente expuestos a condiciones de estrés nutricional.

7.8.2 *Estabilidad de genes de referencia para la normalización de la expresión del gen de la miostatina en músculo aductor, manto y glándula digestiva de N. subnodosus experimentalmente expuestos a condiciones de estrés nutricional.*

Los genes de referencia más estables para el análisis de la expresión de la *miostatina* en músculo aductor de *N. subnodosus* experimentalmente expuestos a condiciones de estrés nutricional fueron *ef-1α* y *rpl8* (Fig. 39) obteniendo el mejor promedio según el programa *RefFinder*.

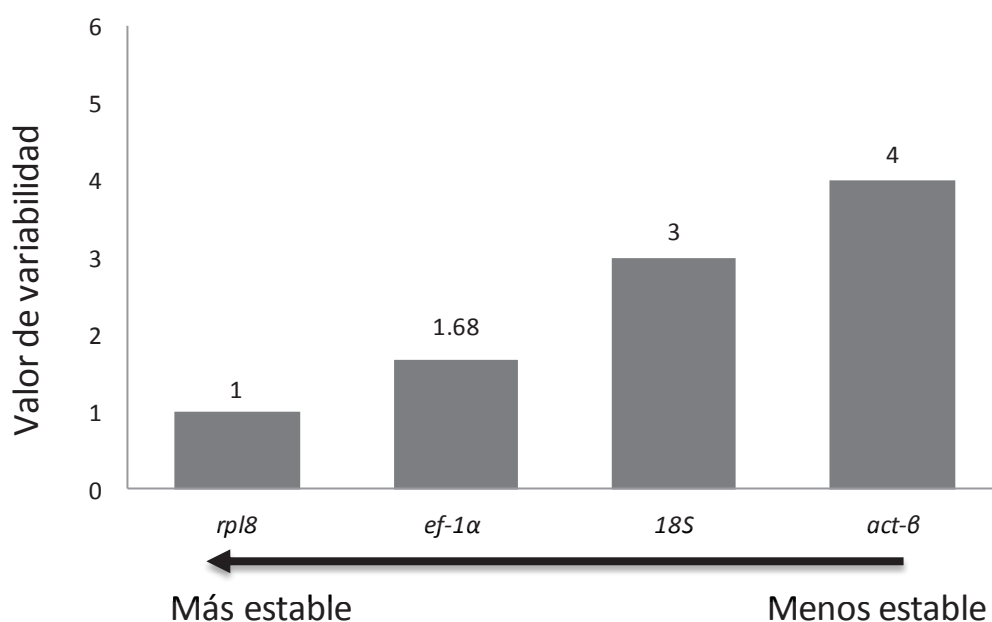


Figura 39. Estabilidad de los genes de referencia estimada con RefFinder con base en los métodos Delta Ct, Bestkeeper, NormFinder y GeNorm. Los genes más estables fueron utilizados para la normalización de la cuantificación de la expresión del gen de la *miostatina* en glándula digestiva, manto y músculo aductor de organismos de *Nodipecten subnodosus* experimentalmente expuestos a condiciones de estrés nutricional.

7.8.3 Análisis de la expresión diferencial por PCR en tiempo real (qPCR) de la miostatina en glándula digestiva, manto y músculo aductor de organismos de *Nodipecten subnodosus* experimentalmente expuestos a condiciones de estrés nutricional.

La expresión de la miostatina en músculo aductor, manto y glándula digestiva de organismos sometidos a estrés nutricional de *N. subnodosus* es mostrada en las figuras 40 y 41. La cuantificación realizada con el par de cebadores qMSTN_1-F y R, muestra que la mayor expresión se da en manto en el grupo de alto alimento, seguido del grupo de bajo alimento del mismo tejido y el tiempo 0 de los tres tejidos sin diferencias significativas ($P > 0.05$). Las diferencias significativas se observaron entre la mayor expresión en manto para los grupos de alto y bajo alimento y la expresión en glándula digestiva para ambos grupos experimentales, la cual fue la menor observada, y también una mayor expresión en manto del grupo de alto alimento que la observada en músculo aductor para ambos grupos experimentales ($P < 0.05$). Entre el muestreo tomado al inicio del experimento (Tiempo 0) y los grupos

experimentales de alto y bajo alimento no se observaron diferencias significativas en cada uno de los tejidos ($P > 0.05$), sin embargo, en manto se puede observar la tendencia a incrementar la expresión de la miostatina hacia el final del experimento en los grupos experimentales, mientras que en músculo aductor y glándula digestiva la expresión de la miostatina tiende a disminuir hacia el final del experimento en ambos grupos de alto y bajo alimento. Un comportamiento similar mostró la cuantificación de la expresión con el par de cebadores qMSTN_2-F y R. La mayor expresión se observó en el grupo de alto alimento de manto, seguido del grupo de bajo alimento y el tiempo 0 de manto y el tiempo 0 de músculo aductor sin diferencias significativas ($P > 0.05$). Las diferencias significativas se observan en manto entre el grupo de alto alimento y la expresión en músculo aductor para los grupos experimentales de alto y bajo alimento y la expresión en glándula digestiva para los tres grupos ($P < 0.05$). En músculo aductor y glándula digestiva no se observan diferencias significativas entre los grupos experimentales analizados ($P > 0.05$), sin embargo se observa que la expresión de la miostatina en músculo aductor tiende a disminuir del inicio hacia el final del experimento en ambos grupos y en glándula digestiva permanece sin grandes cambios mostrando niveles muy parecidos de expresión.

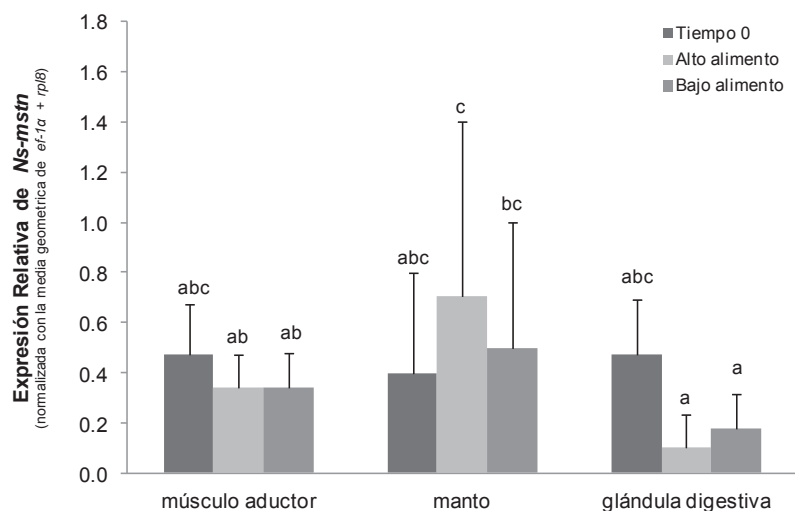


Figura 40. Expresión relativa de la *miostatina* (retransformada de logaritmos) en músculo aductor, manto y glándula digestiva de *N. subnodosus* de organismos expuestos a condiciones experimentales de estrés nutricional. La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_1-F y R. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza

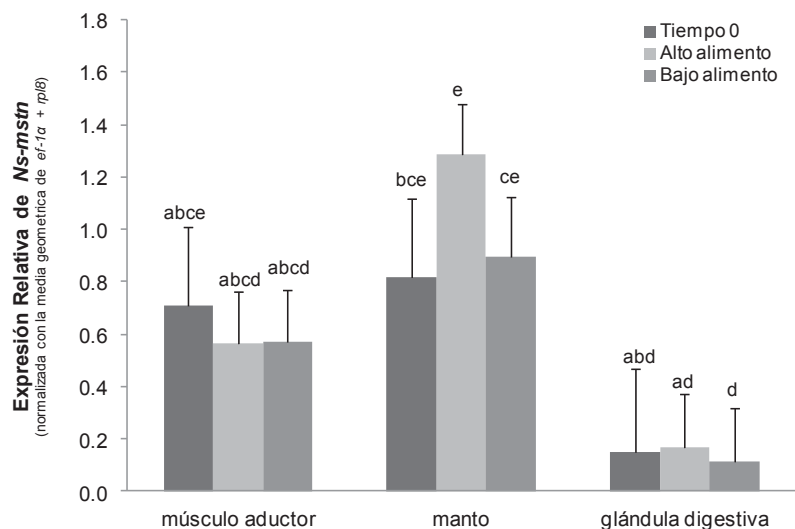


Figura 41. Expresión relativa de la *miostatina* (retransformada de logaritmos) en músculo aductor, manto y glándula digestiva de *N. subnodosus* de organismos expuestos a condiciones experimentales de estrés nutricional. La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_2-F y R. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza.

7.9 Análisis de la expresión del transcrito de la miostatina en diferentes tejidos de *Nodipecten subnodosus* durante un ciclo anual de crecimiento en un sitio de alta productividad

7.9.1 Estabilidad de genes de referencia para la normalización de la expresión del gen de la miostatina analizada en diferentes tejidos de *Nodipecten subnodosus* durante un ciclo anual de crecimiento en un sitio de alta productividad

Para el cálculo de la expresión de la *miostatina* analizada durante un ciclo de crecimiento en un sitio de alta productividad, los genes de referencia más estables fueron *ef-1 α* y *18S*, según el programa *RefFinder* mostrando a estos genes como los que presentan el mejor promedio (Fig. 42).

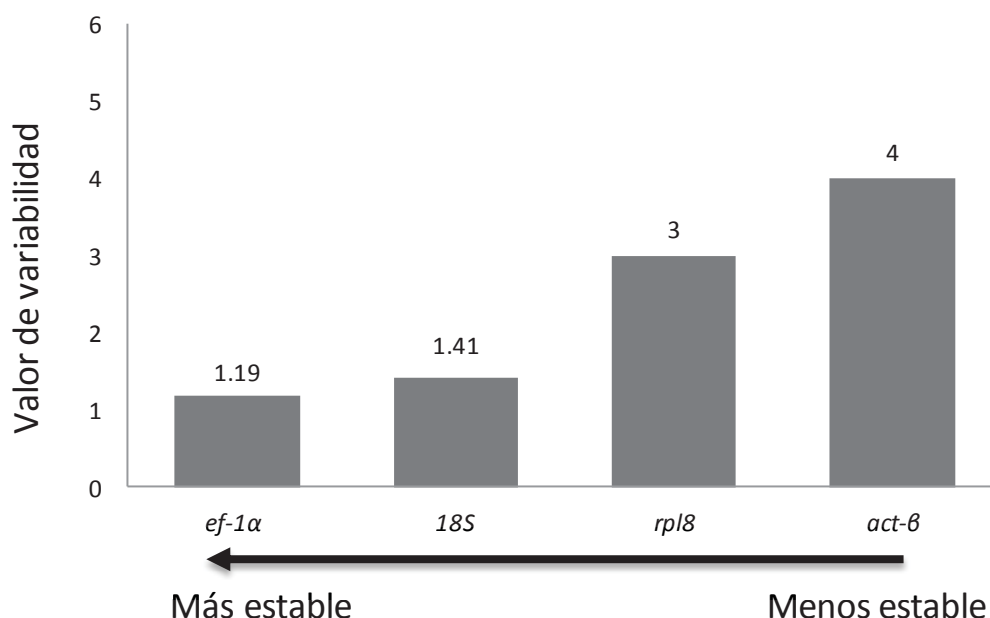


Figura 42. Estabilidad de los genes de referencia estimada con RefFinder con base en los métodos Delta Ct, Bestkeeper, NormFinder y GeNorm. Los genes más estables fueron utilizados para la normalización del gen de la *miostatina* analizada en cinco tejidos de *Nodipecten subnodosus* durante un ciclo de crecimiento.

7.9.2 Análisis de la expresión diferencial por PCR en tiempo real (qPCR) de la miostatina en cinco tejidos de *Nodipecten subnodosus* durante un ciclo de crecimiento.

La expresión de la *miostatina* evaluada en músculo aductor, manto, branquia, glándula digestiva y gónada en organismos de *Nodipecten subnodosus* durante un ciclo de crecimiento se muestra en las figuras 43 y 44.. El análisis estadístico de la cuantificación de la expresión realizada con los cebadores

qMSTN_1 (Fig. 43) muestra que entre meses hay diferencias significativas ($P < 0.05$). Estos resultados indican que la expresión en los tejidos analizados a lo largo del periodo de crecimiento no siguió el mismo patrón de expresión. La expresión de la *miostatina* entre tejidos para cada uno de los meses, muestra que en el mes de febrero todos los tejidos presentan baja o nula expresión como en glándula digestiva y gónada sin diferencias significativas. En el mes de abril la mayor expresión es mostrada en el manto, seguido del músculo aductor sin mostrar diferencias significativas, las diferencias significativas se pueden observar entre el manto y las branquias, glándula digestiva y gónada. En el mes de junio son el músculo aductor y el manto que tienden a presentar una mayor expresión con diferencias significativas con la expresión presentada con glándula digestiva y gónada, siendo la branquia que presenta niveles intermedios de expresión sin diferencias significativas con el resto de los tejidos. La expresión en el mes de junio no presenta diferencias significativas con el mes de febrero, pero si con el resto de los meses. En el mes de agosto, el músculo aductor es el único tejido que muestra un incremento en la expresión con diferencias significativas con el resto de los tejidos en este mes, los cuales presentan bajos niveles de expresión como los presentados en febrero y abril. En el mes de octubre se observa un incremento en la expresión en branquia, no muestra diferencias significativas con músculo y manto en el mismo mes pero si con glándula digestiva y gónada que presentan los más bajos niveles de expresión. La expresión de branquia en este mes es el único tejido que no presenta diferencias significativas con la expresión de músculo aductor en el mes de agosto que presenta los más altos niveles de expresión en el presente estudio.

La cuantificación de la expresión de la *miostatina* con los cebadores qMSTN_2 se muestra en la Fig 44. El análisis estadístico muestra que hay diferencias significativas entre tejidos y entre meses ($P < 0.05$). Al igual que la cuantificación con los cebadores qMSTN_1, los resultados muestran que la expresión en los tejidos analizados no sigue un mismo patrón a lo largo del período de crecimiento.

El mes de febrero muestra la más baja expresión en los tejidos analizados sin diferencias significativas. Para el mes de abril, hay una tendencia a incrementar la expresión en manto, seguido de músculo aductor y branquia, pero no con grandes cambios en glándula digestiva y gónada que muestran los más bajos niveles de expresión, sin mostrar diferencias significativas entre tejidos. En el mes de junio la expresión en manto muestra una tendencia a ser mayor que en el resto de los tejidos, seguido de branquia y músculo aductor, mostrando que glándula digestiva y gónada presentan los menores niveles de expresión. En agosto se observan diferencias significativas en la expresión de la *miostatina* entre tejidos del músculo aductor y las branquias, glándula digestiva y gónada, y se puede observar un incremento en la expresión de junio a agosto en músculo aductor con niveles similares al manto que mantiene la expresión de un mes a otro al igual que el resto de los tejidos. Para el mes de octubre se puede observar un incremento en la expresión de la *miostatina* principalmente en manto, que es el tejido en este mes el que presenta la mayor expresión del presente estudio, seguido sólo de branquia en el mismo mes sin diferencias significativas. En este mes es donde el músculo aductor presenta la menor expresión, seguido de glándula digestiva y gónada.

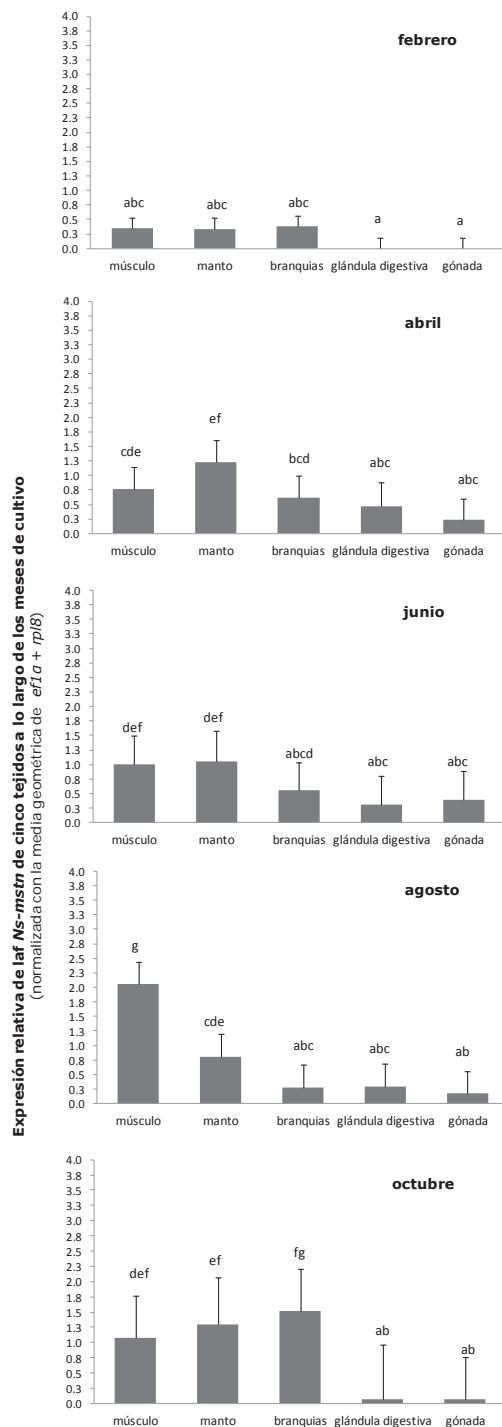


Figura 43. Expresión relativa de la *miostatina* en cinco tejidos de *N. subnodosus* durante su crecimiento (Febrero-2013 a octubre-2013). La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_1-F y R. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza.

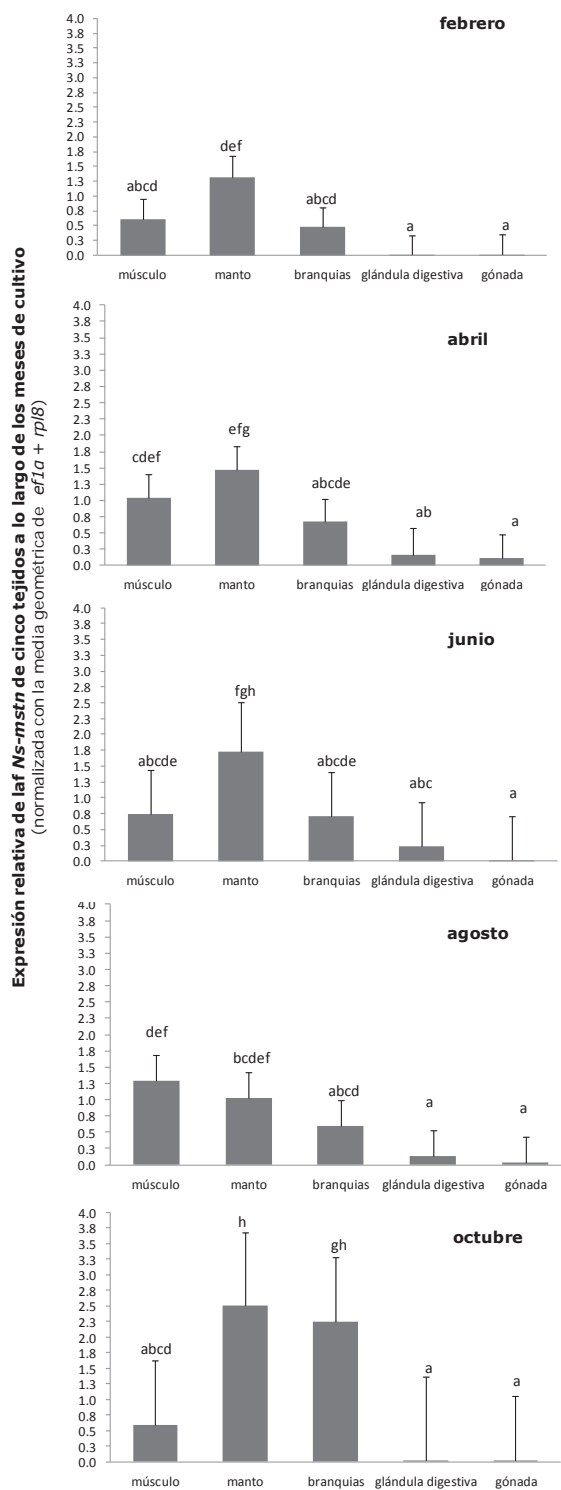


Figura 44. Expresión relativa de la *miostatina* en cinco tejidos de *N. subnodosus* durante su crecimiento (Febrero-2013 a octubre-2013). La amplificación se realizó con los cebadores qMSTN_2-F y R. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); las barras verticales representan las medias con los intervalos de confianza.

8. DISCUSIÓN

La *miostatina* (MSTN) es un importante regulador negativo del crecimiento muscular que ha sido caracterizado desde el ser humano y el ratón hasta en diversas especies de invertebrados de interés comercial. El objetivo principal de este trabajo fue aislar la secuencia que codifica para la proteína de la *miostatina* en la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*, buscando dilucidar su participación en el crecimiento muscular así como en otros procesos a través de la cuantificación de su expresión en otros tejidos como el manto, branquia, glándula digestiva, gónada, además del músculo aductor. Parte de los resultados mostrados en el presente trabajo son la réplica de lo realizado anteriormente en Morelos-Castro (2011), para apegarnos a las guías MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) (Bustin *et al.*, 2009).

8.1. Posibles variantes de la *miostatina* en *N. subnodosus*

Dados los resultados en un trabajo anterior (Morelos-Castro, 2011) donde se observó la expresión de la *miostatina* en gónada y glándula digestiva además del músculo aductor, se consideró importante caracterizar este gen por lo menos en tres tejidos de esta especie: glándula digestiva, gónada y músculo aductor. Hasta este momento, dada la presencia de la *miostatina* en otros tejidos de la almeja mano de león, además del músculo aductor se infirió que este gen tiene un rol adicional al del crecimiento muscular, como ha sido sugerido en algunas especies de peces, por lo que se ha considerado importante caracterizarlo en estos tejidos. Esto último también fue debido a la presencia de una delección de 157 pb observada en una secuencia parcial de la *miostatina* obtenida de glándula digestiva y de gónada de *N. subnodosus*. El análisis de la secuencia proteica del fragmento que contiene la delección indica que esta secuencia pierde las bases que codifican para el sitio de procesamiento proteolítico, el cual es una parte importante ya que, cuando la proteína es secretada, la proteólisis que se lleva a cabo en éste sitio genera la forma madura de la MSTN (Thomas *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 2002).

La presencia de esta secuencia permite inferir que existen transcritos alternos de la *miostatina* en *N. subnodosus*. Huang *et al.* (2011) encuentran y analizan la expresión de cuatro diferentes transcritos de la *miostatina* durante el desarrollo embrionario del músculo esquelético del pato *Anas platyrhynchos*. Estos autores mencionan que los diferentes transcritos encontrados son producto del splicing alternativo del gen de la *miostatina*, dos de ellos dando como producto dos proteínas truncas debido a un codón de paro prematuro resultante de un marco de lectura movido (frame-shift) como consecuencia de eventos de splicing alternativos. Estas proteínas truncas pierden la secuencia que codifica para el sitio de procesamiento proteolítico RXXR y el ligando activo que corresponde al extremo C-terminal. El resultado es la presencia únicamente del extremo N-terminal que corresponde al propéptido de la MSTN, el cual, como sugieren Lee y McPherron (2001), podría estar desempeñando un papel importante en la inactivación de la misma proteína.

En conclusión, la presencia de transcritos alternos puede deberse a la existencia de una autorregulación postraducciona de la MSTN en un mismo organismo. En otros organismos como *Gecarcinus lateralis* (Covi *et al.*, 2008) y *Oncorhynchus mykiss* (Garikipati *et al.*, 2007) han sido también identificados transcritos alternos de la *miostatina* señalados así por la presencia de un codón de paro en la secuencia codificante dando como resultado una proteína trunca. Recientemente Jeanplong *et al.*(2013) reportan por primera vez en mamíferos una variante de la *miostatina*, que es obtenida por splicing alternativo, que promueve la miogénesis *in vitro* en ovejas por su unión a la *miostatina* y actúa como un antagonista en la vía de señalización ya conocida de este gen.

En el presente estudio se han identificado transcritos alternos con la misma delección en los tres tejidos estudiados, músculo aductor, la glándula digestiva y la gónada. Adicionalmente, la amplificación de una secuencia parcial de la MSTN en gónada utilizando un cebador que únicamente va a hibridar en la secuencia con la delección ya mencionada de 157 pb, permiten sugerir que la *miostatina* en *N. subnodosus* está siendo procesada por splicing alternativo y que es necesario continuar con su estudio.

Por otro lado, alternativamente a la existencia de diferentes transcritos de la *miostatina* debido a un mecanismo como el splicing alternativo, existe la posibilidad de la existencia de pseudogenes los cuales pueden producir estos transcritos alternos. En especies como *Oncorhynchus mykiss* (Garikipati *et al.*, 2007), se ha encontrado la presencia de codones de paro en secuencias codificantes, sugiriendo que isoformas de la *miostatina* que estos autores identifican son pseudogenes.

8.2 Secuencia de la *miostatina* de *Nodipecten subnodosus* en músculo aductor.

A partir de los fragmentos obtenidos por medio de la técnica de RACE, se encontraron dos transcritos del gen de la *miostatina* en *N. subnodosus* con UTR 5' de diferentes tamaño. La secuencia más larga, tiene una UTR 5' que presenta un uORF (del inglés upstream Open Reading Frame) y una caja TATA localizada 27 pares de bases (pb) antes del primer nucleótido de la secuencia que contiene la UTR 5' más corta. La caja TATA identificada en el transcrito más largo se encuentra 25-35 nucleotidos antes del sitio de transcripción de la secuencia más corta. Hoy en día se sabe que las cajas TATA son identificadas en la región promotora de los genes y muchas de estas están asociadas con los sitios de inicio de transcripción (Rhee y Pugh, 2012). Inclusive, diferentes sitios de inicio de transcripción han sido encontrados que están asociados con la presencia de más de una caja-TATA en las regiones promotores de genes que tienen varios transcritos (Struhl, 1986; Yamada *et al.*, 2001; Basset *et al.*, 2004; Grace *et al.*, 2004; Farrel y Basset, 2007; Basset *et al.*, 2009). La presencia de más de un transcrito de la *miostatina* ha sido observado por González-Cadavid *et al.* (1998) quien encontró que el gen de la *miostatina* en humanos produce tres transcritos. Además, la secuencia con una UTR 5' mas larga permite inferir que esta se transcribe, dado lo reportado por Hu *et al.* (2010) en *Azumpecten farreri* (antes *Chlamys farreri*) en donde en la región promotora del gen de la *miostatina* reportan tres sitios de inicio de transcripción, pero solo una caja TATA fue identificada 29 nucleotidos antes del

sitio de inicio de transcripción del transcrito reportado en NCBI (EU563852.2). La transcripción de uno u otro transcrito cuando más de una caja TATA está presente puede estar asociada con la regulación de la expresión génica, ya sea en un tejido específico (Struhl, 1986), o durante estadios del desarrollo específicos (Grace *et al.*, 2004). Adicionalmente a la caja TATA, en la UTR 5' del transcrito más largo de la *miostatina* de *N. subnodosus*, el análisis *in silico* permitió la identificación de un uORF (del inglés upstream Open Reading Frame). Estas secuencias tienen un rol en la modulación de la traducción del principal marco abierto de lectura (ORF) (Gray y Wickens, 1998; Wethmar *et al.*, 2010), ya que en algunos casos está correlacionado con la disminución de los niveles de expresión de algunas proteínas porque se reduce la eficiencia del inicio de la traducción del principal ORF, o bien puede promover el incremento de la traducción en respuesta al estrés celular (Barbosa *et al.*, 2013). Esto es, se sabe que los uORFs pueden regular la traducción de los ARN mensajeros de algunos genes bajo condiciones de estrés (Hinnebusch, 2005; Spriggs *et al.*, 2010). La obtención de dos transcritos de la *miostatina* de *N. subnodosus* sugieren que estos podrían participar en diferentes mecanismos de regulación, los cuales deberían ser investigados porque ellos podrían participar en los cambios estacionales de la expresión de la *miostatina* durante el crecimiento en asociación a condiciones de estrés.

Por otro lado, solo una UTR 3' fue encontrada, sugiriendo que los dos transcritos de la *miostatina* de *N. subnodosus* tienen el mismo UTR 3'. El análisis *in silico* de la UTR 3' de los transcritos de la *miostatina* de *N. subnodosus* indican que contienen diferentes elementos *cis*-reguladores conocidos por actuar como un sustrato para proteínas de unión a ARN, las cuales dictan el tiempo de vida de los ARNm y son responsables de la regulación post-transcripcional, del control del inicio de la traducción, de la localización intracelular, y de la estabilización de los ARNm (Moor *et al.*, 2005; Szostak y Gebauer, 2012). Los elementos reguladores encontrados en la UTR 3' de la *miostatina* de *N. subndosus* han sido descritos como elementos involucrados en la regulación positiva y negativa de la traducción (MBE: Musashi binding element), estabilización del ARN (UNRbs: UNR binding site) o

como mediadores de la regulación post-transcripcional (K-box) (Lai *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2004; MacNicol *et al.*, 2011). Los elementos K-box han sido descritos como sitios de reconocimiento de micro ARNs (miRNAs), ya que la UTR contiene heptámeros con secuencias complementarias perfectas a las llamadas semillas de miRNA (ver Lewis *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2005) que son importantes reguladores de la diferenciación celular y proliferación del músculo esquelético (Ichimura *et al.*, 2011; Sayed y Abdellatif, 2011). En estudios recientes sitios de reconocimiento para miRNAs han sido descritos en transcritos de la *miostatina* de vertebrados (Clop *et al.*, 2006; Allen y Loh, 2011; Huang *et al.*, 2012; Miretti *et al.*, 2013) con un sitio conservado para miR-27b conocido por estar localizado en la UTR 3' del ARNm de la *miostatina* en vertebrados (Miretti *et al.*, 2013). Interesantemente, cuando la UTR 3' de los transcritos de la *miostatina* de varias especies de pectínidos fueron analizadas para identificar K-boxes y posteriormente realizar un alineamiento (Fig. 18), se identificó que uno de las secuencias de K-boxes altamente conservada entre las especies es una miRNA seed ACUGUGA (ACTGTGA), la cual es el heptámero de reconocimiento para el miR-27a/b (Urbich *et al.*, 2012; Galhardo *et al.*, 2014). Estos hallazgos son importantes y representan una ruta para futuros estudios en dirección a identificar posibles variantes genéticas (SNPs) en estos sitios de reconocimiento para miRNAs, y analizar cualquier asociación con el crecimiento o el tamaño del músculo aductor de la almeja mano de león, como lo que ha sido encontrado la oveja Texel (Clop *et al.*, 2006), donde han encontrado una relación entre las mutaciones en los sitios de reconocimiento para miRNAs en el transcrito de la *miostatina* y la hipertrofia muscular observada en esa especie.

La proteína codificada por el transcrito de la *miostatina* de *N. subnodosus* muestra el 87-94% de identidad con otras secuencias de MSTN de pectínidos (Kim *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2012; Morales-Collío *et al.*, 2014); esta secuencia muestra características de los miembros de la superfamilia de los TGF- β con una secuencia señal para la secreción, un sitio de procesamiento proteolítico (RSKR) necesario para producir la forma madura de la MSTN, seguido de una región C-terminal conservada que contiene nueve

residuos de cisteína necesarios para formar la estructura intramolecular conocida como nudo de cisteína (cysteine-knot) (McPherron y Lee, 1997). En el presente trabajo, adicionalmente al sitio proteolítico ya mencionado que tiene las características RXXR de todos los TGF- β que es altamente conservado entre los transcritos de MSTN/GDF-8 de todas las especies de invertebrados y vertebrados y en otros miembros de la superfamilia de los TGF- β , en *N. subnodosus* un presunto sitio de escisión por furina (RRKR) fue detectado 73 aminoácidos hacia arriba del sitio de procesamiento proteolítico ya conocido. Este presunto sitio adicional de escisión por furinas es también observado en otras secuencias de la MSTN de pectínidos ya reportadas (*A. irradians*, *C. farreri* y *A. purpuratus*), cuando el análisis es realizado sólo para identificar sitios de escisión por furinas; sin embargo, el sitio no se observa cuando el análisis es realizado para identificar sitios de procesamiento por proprotein convertasas en general. En *N. subnodosus* el presunto sitio de procesamiento por furinas es observado en ambos análisis. Estos sitios de procesamiento adicionales no son únicos de las MSTN de pectínidos ya que se han observado en diferentes proteínas BMPs (del inglés Bone Morphogenetic Protein) y GDFs (del inglés Growth Differentiation Factor) de vertebrados e invertebrados con excepción de la MSTN o GDF-8 de humano (Akiyama *et al.* 2012) y vertebrados mayores. En miembros de la superfamilia de los TGF- β como BMP-4 en *Xenopus* (Cui *et al.*, 2001), el ortólogo de BMP-4 en *Drosophila*, DPP (decantaplegic) (Künnapu *et al.*, 2009), y más recientemente en ortólogos de BMP-5/6/7 en *Drosophila* conocidos como Screw (SCW) y Glass bottom boat (GBB) (Fritsch *et al.*, 2012), dos o más sitios de escisión en el predominio de la proteína han sido identificados. Ha sido propuesto que el procesamiento alternativo por múltiples sitios de escisión o procesamiento puede influenciar la cantidad de ligando producido, puede generar variantes (por ejemplo de DPP y GBB), o puede ser un mecanismo tejido específico para tener una actividad de señalización de largo y corto alcance (Sopory *et al.*, 2010; Akiyama *et al.*, 2012). Debido a la importancia del predominio para la actividad de la MSTN (Lee y McPherron, 2001) y el hecho de que el transcrito de la *miostatina* en *N. subnodosus* fue encontrado expresado en múltiples tejidos, será necesario

realizar estudios para entender la función del sitio alternativo de escisión observado y si es tejido específico.

La estructura que presenta la proteína de la MSTN en *N. subnodosus* es la estructura típica de los TGF- β , que consiste en un motivo conservado de nueve cisteínas, y dos láminas beta antiparalelas extendiéndose hacia la hélice alfa (conocida como wrist region) (Lin *et al.*, 2006). La estructura de la MSTN de *N. subnodosus* muestra una mayor similitud con la estructura tridimensional de la *mioglianina* de *D. melanogaster* que con la estructura de GDF-8 en humanos, donde la hélice alfa es más corta en estas especies que en humanos. Hasta el momento no se ha observado que la mayor o menor cantidad de aminoácidos en la hélice alfa tenga implicaciones con respecto a su función.

8.3 Expresión temporal de la miostatina en músculo aductor de *N. subnodosus* durante un ciclo anual de crecimiento en un sitio de baja productividad y análisis puntual de su ubicuidad

Los resultados obtenidos en el análisis de expresión de la *miostatina* en el músculo aductor de *N. subnodosus* en Bahía de Loreto BCS en el presente trabajo presentan diferencias estacionales en los niveles de expresión de este gen entre el verano y el invierno, con niveles de expresión significativamente bajos durante el invierno con respecto al verano. Este patrón de expresión durante el crecimiento parece estar relacionado con la disponibilidad de alimento y la gametogénesis/desove. Es ya conocido que estos dos factores tienen un efecto sobre la tasa de crecimiento de los pectínidos (Lodeiros y Himmelman, 2000; Blicher *et al.*, 2010; Lodeiros *et al.*, 2012).

En el sitio de cultivo, Bahía de Loreto se registran temperaturas tropicales y sub-tropicales (Hendrickx *et al.*, 2005), alcanzando temperaturas de 30°C en verano y de 17.5 °C en invierno (Félix-Pico *et al.*, 1999); durante este estudio se observó una relación inversa entre la temperatura y la concentración de clorofila en el sitio de crecimiento, encontrando los más bajos niveles de alimento o de clorofila-a en los meses de verano en ambos años (julio y septiembre del 2008, y junio y agosto del 2009). Adicionalmente, la primera maduración y el desove de estos organismos ocurrieron en los meses de

verano del segundo año (junio y agosto del 2009 respectivamente, Ramirez-Arce JL, datos no publicados). Durante estos meses de verano se observaron altos niveles de expresión de la *miostatina* junto a un decremento en la ganancia de biomasa (ambos años) y en músculo aductor (en el segundo año). La ganancia en el peso de músculo aductor no pudo ser estimada el primer verano debido a que los organismos estaban muy pequeños para que el músculo aductor pudiera ser diseccionado y pesado (mayo 2008). Nuestros resultados concuerdan con los estudios realizados en peces, los cuales han mostrado que la expresión de la *miostatina* es influenciada por el estado nutricional, modulando el crecimiento muscular de acuerdo a la disponibilidad de nutrientes, en otras palabras, el incremento en la expresión de la *miostatina* ha sido observada bajo restricción de alimento, y una disminución en la expresión de la *miostatina* ha sido observada cuando los organismos son de nuevo alimentados (re-alimentación) (Jeanplong *et al.*, 2003; Terova *et al.*, 2006). Adicionalmente, altos niveles de la expresión de la *miostatina* han sido observados en organismos en desove, lo cual está asociado a la restricción del crecimiento del músculo aductor durante este estadio (Johansen y Overturf, 2005).

En el presente estudio no sólo fue observada la restricción del crecimiento muscular sino que también fue observada atrofia en el músculo aductor. Ha sido reportado que la reducción en la expresión de la MSTN causa hipertrofia muscular (Lee y McPherron, 1999), y que la alta expresión de la MSTN resulta en la inducción de atrofia y pérdida de masa muscular como resultado de la disminución en el número de fibras musculares, el diámetro del músculo y el contenido de proteínas (Durieux *et al.*, 2007; Sandri, 2008). La disminución en el contenido de proteínas inducido por la MSTN ha sido asociado con el incremento en la expresión de genes involucrados en la proteólisis (McFarlane *et al.*, 2006), y más recientemente, ha sido reportado que la MSTN actúa como un regulador negativo de la síntesis de proteínas en vertebrados (Amirouche *et al.*, 2009; Trendelenburg *et al.*, 2009). En invertebrados, Covi *et al.* (2010) encontraron que la *miostatina* en cangrejos está correlacionada negativamente con la síntesis de proteínas, y proponen que la MSTN en crustáceos funciona

como un inhibidor de la síntesis de proteínas en el músculo. De acuerdo con el rol de la MSTN como un inductor de atrofia muscular, el incremento de la expresión de *miostatina* puede ser asociada con la pérdida de peso en el músculo aductor (ganancia negativa) observada del mes de junio al mes de agosto del 2009, y la atrofia muscular observada, como resultado de una significativa reducción en el número y tamaño de las fibras musculares (datos reportados en Morelos, 2011). Estos resultados son consistentes con el rol de regulador negativo del crecimiento de la MSTN, indicando que este gen puede ser un controlador del crecimiento muscular en pectínidos como ha sido descrito en vertebrados, inclusive si también realiza otras funciones además del crecimiento, ya que su expresión fue observada también en otros tejidos. Además, recientemente ha sido descrito que la MSTN está involucrada en el metabolismo de la glucosa, incrementando la glucólisis e inhibiendo la biosíntesis de glucógeno en las fibras musculares (Chen *et al.*, 2010) lo cual añade soporte a previas conclusiones acerca de que el músculo aductor es el órgano de reserva más importante en pectínidos para almacenar reservas energéticas en forma de glucógeno el cual es considerado como el principal combustible de reservas para la vitelogénesis (Barber y Blake, 1985; 1991).

Al realizar el análisis puntual de ubicuidad tisular, el transcrito de la *miostatina* de *N. subnodosus* fue detectado en todos los tejidos analizados. El patrón de expresión entre tejidos fue similar a las especies de pectínidos que ya han sido estudiadas (Kim *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2012), con altos niveles de expresión en el músculo, seguido del manto y las branquias. Sólo en *P. yessoensis* se ha reportado un patrón diferente, donde las branquias son el tejido que muestra una mayor expresión seguido del músculo aductor (Kim *et al.*, 2007). Estos resultados son diferentes a los observados en mamíferos donde la expresión es limitada al músculo esquelético (McPherron *et al.*, 1997) pero similar a otros invertebrados incluyendo los pectínidos.

8.4 Expresión temporal de la *miostatina* en diferentes tejidos de *Nodipecten subnodosus* durante un ciclo anual de crecimiento en un sitio de alta productividad

Los resultados obtenidos al analizar la expresión temporal de la *miostatina* en musculo aductor de *N. subnodosus* en un sitio de baja productividad como Bahía de Loreto, BCS, permitió demostrar que la *miostatina* está involucrada en la regulación del crecimiento muscular, y que los cambios en la expresión de este gen fueron posiblemente debidos a la baja disponibilidad de alimento, así como a la reproducción. Sin embargo, debido a que la evaluación puntual para establecer la ubicuidad tisular en Bahía de Loreto se realizó en el mes de agosto del 2009, cuando las condiciones ambientales eran extremas, fue importante investigar si el patrón de expresión de la *miostatina* en músculo aductor y los otros tejidos en *N. subnodosus* sería el mismo cuando se evalúa en un sitio con alta productividad en el caso del músculo aductor durante su crecimiento, pero además si se presentaba el mismo patrón de expresión en todos los tejidos a lo largo del ciclo de crecimiento.

En esta parte del presente trabajo se evaluó la expresión de la *miostatina* de *N. subnodosus* en un sitio de alta productividad como lo es Rancho Bueno, pero además de evaluar la expresión en músculo aductor se evaluó en otros tejidos de la almeja como el manto, las branquias, la glándula digestiva y la gónada, en donde ya se había observado la expresión de la *miostatina*. En el análisis en Rancho Bueno se observó que en el músculo aductor se presentó un patrón de expresión similar al observado en Bahía de Loreto, principalmente asociado al incremento de temperaturas que se conoce se presentan en el sitio de cultivo hacia los meses de verano. Sin embargo, el análisis en el resto de los tejidos analizados, como el manto y las branquias, muestran un patrón diferente de expresión variando durante los meses de crecimiento, mostrando inclusive iguales o mayores niveles de expresión que la *miostatina* de *N. subnodosus* en el músculo aductor. En moluscos como *A. purpuratus* (Morales-Collío *et al.*, 2014), *A. irradians* (Guo *et al.*, 2012), *Azumapekten farreri* (Hu *et al.*, 2010) y *Pinctada fucata* (Li y Li, 2014) se ha realizado análisis de ubicuidad puntuales en organismos adultos o de un año de edad, determinando que la *miostatina* se

expresa en diversos tejidos, concluyendo que la mayor expresión de la *miostatina* se observa en el músculo. Sin embargo, nuestros resultados muestran que los niveles de expresión de la *miostatina* entre tejidos pueden variar con la edad (meses de crecimiento), indicando que el músculo aductor no es siempre el tejido primario de expresión de este gen en *Nodipecten subnodosus*.

La primera descripción del gen de la *miostatina* en invertebrados fue realizada por Lo y Frasch (1999) en *Drosophila melanogaster*, donde fue descrito como un ortólogo de la *miostatina* y el gen GDF-11, demostrando que se expresaba en tres tipos de músculo (somático, visceral y en el corazón), así como en las células somáticas. Posteriormente se demostró que la *mioglianina* está involucrada también en la formación de la unión neuromuscular (Lee-Hoeflich *et al.*, 2005). Esto contrasta con los vertebrados mamíferos en los cuales la *miostatina* es expresada predominantemente en músculo esquelético (McPherron *et al.*, 1997). Sin embargo, entre los vertebrados inferiores como los peces, donde se han identificado cuatro parálogos de la *miostatina* en algunas especies de salmónidos, se ha encontrado que la *miostatina* es expresada en diversos tejidos, incluyendo el músculo, branquias, bazo, ovarios, intestino, cerebro y testículos (Rodgers *et al.*, 2001; Maccatrozzo *et al.*, 2001). La expresión observada en otros tejidos en adición al músculo esquelético en peces permite sugerir que la *miostatina* en estas especies podría regular otros procesos de crecimiento y diferenciación además de regular negativamente el crecimiento del músculo esquelético (Amali *et al.*, 2004), aunque esos procesos que pueden estar siendo regulados por la *miostatina* no son todavía conocidos. Hasta el momento, estudios en pez cebra para el gen de la *miostatina*, han demostrado el incremento en el número o tamaño de células musculares, y en estudios funcionales con ARN de interferencia (RNAi) ha sido demostrado que el bloqueo de este gen durante las primeras etapas del desarrollo dan como resultado hiperplasia e hipertrofia (Acosta *et al.*, 2005; Amali *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2003). A diferencia de los resultados obtenidos en pez cebra, en invertebrados como los camarones penéidos, donde se ha demostrado que el gen *miostatina*/GDF-11 se expresa en diversos tejidos, estudios con RNAi no

encontraron que el silenciamiento de este gen resultara en un incremento en el número y tamaño de las células musculares (De Santis *et al.*, 2011a; Lee *et al.*, 2015), sugiriendo que el gen MSTN/GDF-11 en crustáceos penéidos podría tener diferentes funciones que la MSTN de mamíferos, incluso sugiriendo un papel como regulador positivo más que negativo (De Santis *et al.*, 2011a).

Los diferentes estudios que han sido realizados principalmente en crustáceos, y los resultados obtenidos en el presente trabajo en moluscos, permiten sugerir que la proteína MYO/MSTN/GDF-11 tiene otras funciones que el control del crecimiento del músculo en moluscos, crustáceos, o en general en invertebrados. La alta expresión de este gen en otros tejidos además del músculo, como fue observado en el manto de *N. subnodosus* durante el periodo de crecimiento, da soporte a lo mencionado por Kim *et al.* (2004) donde sugieren que la expresión en este tejido en moluscos bivalvos puede estar relacionada con la formación de la concha. En moluscos, el manto es el órgano directamente responsable de la formación de la concha a través de la secreción de la matriz de la concha en el espacio extrapaleal donde se lleva a cabo la biomineralización (formación de cristales minerales a partir de iones en solución para formar estructuras como la concha) (Ozawa *et al.*, 2008; Addadi *et al.*, 2006; Marin *et al.*, 2008; Audino *et al.*, 2015).

En este momento es importante mencionar que diferentes estudios en vertebrados han asociado diferencias en la biomineralización en huesos de la mandíbula entre ratones con expresión normal de la *miostatina* y los ratones de nula expresión (myostatin null mice) (Hamrick, 2003; Nicholson *et al.*, 2006; Ravosa *et al.*, 2007; Elkasrawy y Hamrick, 2010), y en estudios más recientes ha sido mostrado que el uso de un receptor de activina tipo IIB soluble (ActRIIB-Fc), usado para inhibir la señalización a través de receptores de activina, incrementa no sólo la masa muscular sino que también incrementa la mineralización, en contraste con el hecho de que cuando se utiliza un anticuerpo de *miostatina* esto sólo incrementa la masa muscular (Chiu *et al.*, 2013), sugiriendo que otros factores podrían estar involucrados en el proceso de mineralización a través de la señalización por receptores de

activina. Uno de estos factores podría ser el Factor de Crecimiento y Diferenciación 11 (GDF-11 por sus siglas en inglés Growth Differentiation Factor-11), una proteína que cuando el gen es mutado, da como resultado alteraciones del esqueleto axial (McPherron *et al.*, 1999), y cuando muta en conjunto con la MSTN (MSTN^{-/-}/GDF-11^{-/-}), resulta en defectos adicionales en el esqueleto no observados en mutantes simples indicando que tiene una función en la regulación del eje esquelético en mamíferos como los ratones (McPherron *et al.*, 2009). Adicionalmente, en mamíferos como ratones y perros, el gen GDF-11 está involucrado en la diferenciación de las células madre de la pulpa dental en los odontoblastos y por lo tanto en la formación de la dentina (Nakashima *et al.*, 2002; 2003). Además, en especies de aves, GDF-11 ha sido asociado con el control de la formación del esqueleto apendicular en pollos (Gamer *et al.*, 2001) regulando negativamente la condrogénesis y la miogénesis. Adicionalmente, en estudios realizados en la formación de la dentina ha sido observado un incremento en las fibras de colágeno en la matriz extracelular por estimulación de GDF-11 electrotransferido (Nakashima *et al.*, 2004). Interesantemente, se sabe que en manto el principal componente es el colágeno, el cual se encuentra en una matriz extracelular especializada en las membranas basales del epitelio que recubre los tejidos en moluscos (Paulsson, 1992; Shen *et al.*, 2007; Estrada *et al.*, 2011), y ha sido mostrado que la concentración de colágeno en el manto tiene una variación temporal en pectínidos (Mizuta *et al.*, 2007), lo que nos permitiría explicar las variaciones en la expresión de *mstn/gdf-11* de *N. subnodosus*, cómo proponemos llamar a este gen a partir de este momento. Esto es, con base en el conocimiento que se tiene hasta el momento acerca de las funciones de GDF-11 en vertebrados, nos permite especular que en invertebrados como los moluscos, el gen *miostatinal/gdf-11* puede estar involucrado en la formación de la concha, particularmente a través de la vía de señalización de la biomineralización.

El segundo tejido que mostró altos niveles de expresión de la *mstn/gdf-11* en *N. subnodosus* en este análisis, inclusive más alta que el músculo aductor y el manto en el mes de octubre, son las branquias, aunque el resto del periodo del

crecimiento este tejido mostró bajos niveles de expresión, por debajo tanto del músculo aductor como del manto. En otros pectínidos la expresión de la *mstn/gdf-11* en branquias ha sido reportada con niveles cercanos a cero (Kim *et al.*,2004; Hu *et al.*, 2010; Guo *et al.*,2012), aunque en peces la expresión de la *miostatina* en branquias ha sido reportada múltiples veces (Østbye *et al.*,2001; Radaelli *et al.*,2003; De Santis *et al.*,2011b; Kanjanaworakul *et al.*,2015), y ha sido propuesto que la presencia de este gen en este tipo de tejido está relacionado con la osmoregulación (Rodgers *et al.*,2001; Radaelli *et al.*,2003; Amali *et al.*,2004). Alternativamente a una función no claramente establecida en osmorregulación, existe un estudio que indica un posible papel de GDF-11 en el desarrollo y diferenciación de los arcos branquiales de vertebrados, habiendo encontrado su expresión en embriones de ratón (Nakashima *et al.*, 1999). Los arcos branquiales dan origen a las branquias en peces (Schilling *et al.*, 1996), aunque en invertebrados no existen arcos branquiales como los de vertebrados, por lo que en este momento es imposible concluir que *mstn/gdf-11* tiene un papel en la diferenciación de la branquia. Por otro lado, es ya conocido que las branquias son el primer órgano expuesto a estresores abióticos como son los cambios oceanográficos y fisicoquímicos del ambiente (Cannuel *et al.*, 2009) y en moluscos estos cambios como las corrientes y la salinidad, pueden causar entre otros problemas, estrés osmótico (Christophersen y Strand, 2002; Maboloc *et al.*, 2014) así como daño físico o estructural a las branquias. Sin embargo, si la alta expresión de la *mstn/gdf-11* en las branquias de *N. subnodosus* en el mes de octubre está asociada con estrés osmótico o daño físico no puede ser afirmado, aunque sí podría asociarse con posible estrés general debido a las condiciones climáticas extremas que se observaron durante el mes de octubre en el sitio de cultivo como resultado del huracán Octave y las altas precipitaciones ocurridas en el área (<http://smn.cna.gob.mx/climatologia/analisis/reporte/RC-October13.pdf>), con consecuentes fuertes corrientes y cambios de salinidad.

Con los resultados observados hasta el momento se puede concluir que el gen de la *mstn/gdf-11* en *N. subnodosus* tiene funciones adicionales a la regulación negativa del crecimiento muscular, aunque será necesario realizar

investigaciones funcionales para dejar claro la o las funciones de este gen en la almeja mano de león.

Como soporte a estos resultados, el análisis filogenético muestra que la MSTN, GDF-11 y la Mioglianina se agrupan en una misma rama, separados de todos los demás miembros de la superfamilia de TGF- β como los BMPs, Inhibinas, GDF-1, MAVERICK, GBB y DPP. Todas las MSTN de moluscos, la MSTN/GDF-11 y las MSNT/GDF-11 de *N. subnodosus*, se muestran como homólogos de Mioglianina (MYO) de *Drosophila* spp. El gen de la *mioglianina* de *Drosophila melanogaster* fue el primero reportado en invertebrados, y fue descrito como un ortólogo de la *miostatina* y *gdf-11* de vertebrados (Lo y Frasch, 1999) debido a la alta similitud en homología presentada con esos dos genes. El gen *gdf-11* en vertebrados es un parálogo de la *miostatina*, y estos dos genes presumiblemente derivan de una duplicación de un gen ancestral único (Xu et al., 2003; Xing et al., 2007; Gabillard et al., 2013). De acuerdo con esta información, entre invertebrados hay sólo un gen (MYO/MSTN/GDF-11), pero con diferencias entre las secuencias de moluscos y crustáceos que pudieron ser observadas al ser realizado el alineamiento de la región C-terminal del péptido maduro de Mioglianina, MSTN y GDF-11. Con estos análisis se encontró que el sitio proteolítico esperado en MYO/MSTN/GDF-11 es altamente conservado entre las proteínas de moluscos y *Drosophila* spp., mientras que en crustáceos hay una inserción de un aminoácido (asparagina) a la derecha del sitio de procesamiento proteolítico. Adicionalmente, en las secuencias proteicas completas de *Drosophila* spp, Moluscos y Crustáceos se encontraron diferentes números de sitios proteolíticos reconocidos por furinas.

Se encontró que en la MYO de *Drosophila* spp tiene solo un sitio de reconocimiento por furina, la MSTN de moluscos tiene dos sitios de reconocimiento con excepción del ostión *Crassostrea gigas* para el cual se utilizó una secuencia de la proteína reportada como “predicted” y en crustáceos la proteína MSTN/GDF-11 tiene dos o tres sitios de reconocimiento por furinas. En este mismo trabajo ya se había reportado la presencia de dos sitios de reconocimiento por furinas en la MSTN de los pectínidos, incluyendo

Nodipecten subndosus. Estos resultados son interesantes ya que ninguna MYO o MSTN de vertebrados tiene más de un sitio de reconocimiento de furinas (Lo y Frasch, 1999; McPherron y Lee, 1997), pero otros miembros de la superfamilia de los TGF- β como BMP2/4/DPP y BMP 5/6/7/GBB tienen más de un sitio de reconocimiento de furinas (ya sea uno o tres), en algunos casos en combinación de motivos de reconocimiento de furina óptimos y mínimos, sugiriendo que los diferentes tipos de procesamiento por furinas han evolucionado en diferentes especies para alcanzar la óptima señalización para la maduración del péptido (Künnapu *et al.*, 2009), así como su rango de actividad y señalización (Cui *et al.*, 2001; Degrin *et al.*, 2004). Hasta este momento, la función del sitio de reconocimiento adicional encontrado en MSTN/GDF-11 en moluscos y crustáceos no es conocida, pero podemos sugerir que puede estar relacionado con la generación de variantes de esta proteína o como un mecanismo tejido-específico relacionado el rango de señalización (Sopory *et al.*, 2010; Akiyama *et al.*, 2012).

8.5 Expresión diferencial de la *mstn/gdf-11* en organismos de *N. subndosus* sometidos a condiciones de estrés nutricional.

En todos los organismos la alimentación es un factor determinante en el control del crecimiento, que ya sea directa o indirectamente influencia sobre vías de señalización de los genes involucrados en el crecimiento somático, como por ejemplo la *mstn/gdf-11*. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la alimentación tiene una participación importante en la capacidad de crecimiento de *Nodipecten subndosus*, principalmente del músculo aductor como se observó en Bahía de Loreto. También se demostró que la *mstn/gdf-11* está involucrada con el posible control negativo del crecimiento del músculo aductor en esta especie, ya que su expresión fue inversamente proporcional al crecimiento y éste a su vez, fue directamente proporcional a la disponibilidad de alimento. Por esta razón se consideró importante, conocer bajo condiciones controladas de laboratorio, cual es la respuesta de la *miostatina* en *N. subndosus* en condiciones de estrés alimenticio o bien, restricción nutricional. Por lo tanto, se realizaron dos

experimentos en los que se utilizaron organismos de *N. subnodosus* de diferentes edades y orígenes, observando diferentes respuestas.

En ambos experimentos, no se observaron diferencias significativas entre el grupo control (alto alimento) y el grupo experimental (bajo alimento) en los tejidos analizados. Aunque hasta el momento no se han realizado trabajos en los que se investigue como se relaciona la expresión de la *mstn/gdf-11* con el estado nutricional en invertebrados, en diferentes especies de vertebrados se han realizado estudios donde se cuantifica la expresión de la *miostatina* bajo condiciones de ayuno, restricción alimenticia o realimentación. Esto ha permitido sugerir que la nutrición va a tener un impacto sobre la expresión de la *miostatina* dependiendo de la especie y del tiempo de exposición al estrés que se esté evaluando y además que también va a estar relacionada con el estadio de desarrollo o edad de los organismos. Por ejemplo, en ovejas, Jeanplong *et al.* (2003) demostraron que esta especie al mantenerse en condiciones de restricción nutricional o desnutrición por prolongado tiempo (22 semanas), la expresión del transcrito de la *miostatina* muestra cambios durante las semanas a las que estuvieron sometidos a dicho estrés, mostrando en las primeras 4 semanas una disminución en la expresión de este transcrito. Estos autores sugieren que el músculo pasa por fases de adaptación a la desnutrición, generando efectos acumulativos durante este periodo que va a dar como resultado una expresión diferencial en respuesta al efecto de la duración del estrés nutricional. Por otro lado, en aves se ha reportado la relación positiva del consumo de nutrientes y los niveles de expresión del transcrito de la *miostatina* en diferentes edades, y sugieren que la disminución en la expresión de la *miostatina* durante el ayuno o deficiencia de nutrientes, puede ser un mecanismo de protección para evitar la pérdida muscular (Guernec *et al.*, 2004). Sin embargo no en todas las especies se han observado los mismos resultados, en cerdos no se observó que la privación de alimento tuviera efectos sobre la expresión de la *miostatina* en individuos que habían sido sometidos a ayuno durante 3 días (Ji *et al.*, 1998), y en ratas, observaron que la disminución del alimento en adultos no resulta en cambios en la expresión de la *miostatina*, aunque observaron una pérdida muscular significativa (Carneiro

et al., 2013). En peces los resultados han dependido principalmente de la especie, por ejemplo en larvas de tilapia *Oreochromis mossambicus* sometidas a ayuno prolongado, se observó la disminución en la expresión de la *miostatina*, pero después de haberse observado bajos niveles de expresión durante el comienzo del ayuno, mientras que en adultos no hubo alteración en la expresión de este gen (Rodgers *et al.*, 2003). En la lubina *Dicentrarchus labrax*, no observa alteración en la expresión de la *miostatina* en los primeros 4 días de ayuno, pero hay un incremento significativo de la expresión al final de las 4 semanas en las cuales los organismos fueron sometidos a bajos niveles de alimento, observándose una disminución gradual de la misma en las semanas subsecuentes de realimentación (Terova *et al.*, 2006), aunque en otras especies no se observan cambios en la expresión de la *miostatina* durante la realimentación (Chauvigné *et al.*, 2003). Estos trabajos, aunque son en vertebrados, pueden ayudar a explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo donde no se muestran cambios significativos en la expresión de la *miostatina* en *N. subnodosus* en los organismos sometidos a estrés nutricional, aunque, en el primer experimento si se puede observar que la expresión tiende a disminuir en el músculo aductor del grupo que se sometió a bajo alimento, mientras que en el segundo experimento ambos grupos permanecen sin cambios.

Adicionalmente, la edad de los organismos utilizados en cada experimento representa una variable que, podemos inferir, va a influir en la expresión de la *mstn/gdf-11* en estos organismos. En el primer experimento de estrés nutricional, donde se utilizaron organismos de aproximadamente más de dos años de edad, la mayor expresión se observó en el músculo aductor, mientras que en el segundo experimento donde la mayor expresión se observó en el manto, se utilizaron organismos que apenas cumplirían un año de edad. Si bien se ha concluido en evaluaciones puntuales previas que la mayor expresión de la *mstn/gdf-11* en pectínidos como en *A. irradians* y *A. farreri* se da en el músculo aductor (Hu *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2012), incluyendo los resultados obtenidos en agosto del 2009 en este trabajo en individuos de casi dos años de edad, los resultados del análisis de expresión en diferentes tejidos de *N.*

subnodosus durante un ciclo de crecimiento en Rancho Bueno, un sitio reconocido como de alta productividad durante todo el año, permiten inferir que la expresión de la *mstn/gdf-11* depende no solamente de las condiciones nutricionales sino posiblemente de otros factores ambientales como la temperatura, la salinidad y la edad de los organismos. Lo anterior puede explicar por qué la mayor expresión de la *mstn/gdf-11* en el segundo experimento de estrés nutricional se haya dado en el manto y no en el músculo aductor.

8.6 Evaluación del estado metabólico del músculo aductor de *N. subnodosus* a través de la expresión génica diferencial en organismos sometidos a condiciones experimentales de estrés nutricional

La restricción en la alimentación o inclusive el ayuno, no es inusual en organismos marinos, ya que la disponibilidad de alimento fluctúa por periodos en el ambiente marino, provocando en los organismos alteración en el metabolismo. Durante los periodos en los que la disponibilidad de alimento es baja, la utilización de reservas energéticas es necesaria. En moluscos los carbohidratos en forma de glucógeno y los lípidos son la fuente principal de energía que es almacenada en tejidos como el músculo aductor, el manto y la glándula digestiva. Existen diversos trabajos en el género *Nodipekten* donde han reportado la movilización de reservas musculares destinadas a la reproducción (Lodeiros *et al.*, 2001; Arellano-Martínez *et al.*, 2004b), pero no se ha reportado cuales son las vías metabólicas involucradas en la utilización de reservas en condiciones de estrés nutricional. Para tal efecto la utilización de un microarreglo heterólogo en *D. melanogaster* permitió observar el estado metabólico de los organismos sometidos a estrés nutricional, donde las rutas metabólicas de carbohidratos y lípidos fueron las más afectadas.

El anabolismo y catabolismo del glucógeno se producen a través de diferentes rutas con la finalidad de disponer de glucosa para la producción de energía. La glucogenólisis es el proceso mediante el cual se obtendrán unidades de glucosa mediante la degradación del glucógeno, el cual es uno de los principales materiales de reserva en moluscos, en respuesta a la falta de

glucosa circulante. La sobre regulación del transcrito que activa la enzima *Fosforilasa quinasa (Phk)* (CG8475) la cual activa a la enzima *Glucógeno fosforilasa*, nos permite inferir que esta ruta metabólica está activa. Debido a que la utilización del glucógeno está determinada por la cantidad de alimento disponible en el medio, este es utilizado como un indicador de la condición fisiológica de los organismos frente a una condición de estrés (Beltrán-Lugo *et al.*, 2006; Ocaño-Higuera *et al.*, 2011). En diversos moluscos se ha demostrado que bajo condiciones de estrés la expresión de la enzima *Glucógeno fosforilasa* es alterada (Storey, 1987; Sivaramakrishna y Radhakrishnaiah, 2000), por lo que la glucogenólisis llevada a cabo en los organismos de *N. subnodosus* sometidos a estrés nutricional, dio posiblemente como resultado el incremento de sustrato para la glucólisis. Esto puede comprobarse por el incremento de la expresión de dos transcritos que codifican para enzimas que participan en esta vía metabólica, la *Fosfoglucosa isomerasa (Pgi)* (CG8251) y la *Fosfofructoquinasa (Pfk)* (CG4001) que son enzimas que participan en la 2ª y 3ª reacción de la glucólisis. La 2ª reacción de la glucólisis es la conversión de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato, en una reacción reversible. La 3ª reacción es la conversión de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bifosfato donde actúa la *Pfk*, la cual desempeña un importante papel en el control de la glucólisis y es modulada por el estado energético del individuo (Voet *et al.*, 2009). Por ejemplo, en peces se han analizado los niveles de expresión de la *Pfk* en función de la privación de la alimentación y de la realimentación, observando que hay una disminución de esta enzima en las primeras semanas de la disminución del alimento y un incremento con una realimentación prolongada (Méndez y Wieser, 1993; Viegas *et al.*, 2013). En invertebrados Sánchez-Paz *et al.* (2008) analizaron la expresión de la *Pfk* en el intestino de *L. vannamei* en un periodo de inanición, observando que esta enzima incrementa su expresión en relación al glucógeno almacenado.

Aunque con el incremento en la expresión de estas enzimas *Pfk* y *Pgi* podemos inferir que la vía de la glucólisis está activa, la disminución en la expresión del transcrito que codifica para la enzima *Phosphoglycerate mutase (Pgm)* (CG17645) que participa en la 8ª reacción de la glucólisis, nos permite inferir

que esta vía no está destinada a la producción de piruvato, sino que está encaminada a la producción de glicerol. El glicerol es un precursor de los triglicéridos, el cual necesita ser activado formando glicerol-3-fosfato (Devlin, 2009). Para que se lleve a cabo la reacción de activación es necesaria la presencia de la enzima *Glicerol quinasa* (Gk) (CG7995) para la cual su transcrito está sobre-regulado en músculo aductor de *N. subnodosus*. El incremento en la expresión de estas enzimas nos permite inferir que el incremento en la concentración del glicerol es para la formación de triglicéridos y fosfolípidos que serán utilizados/acumulados en el músculo.

Adicionalmente, se pudo identificar la regulación diferencial de dos transcritos que codifican para dos Lipasas, en donde una de las cuales está directamente relacionada con la degradación de triglicéridos (CG11406 y CG11600). Las lipasas actúan durante la lipólisis, la cual permite la utilización de triglicéridos. Hasta el momento estos resultados indican una estimulación de la glucogenólisis y una activación de la glucólisis, para la formación de glicerol que activa la formación de triglicéridos los cuales van a ser utilizados por medio de la lipólisis. En vertebrados, específicamente en peces se ha observado el incremento en el metabolismo de la glucosa con incrementos en la concentración de glicerol en organismos sometidos a ayuno, relacionándolo principalmente con el incremento de vías gluconeogénicas para la obtención de glucosa (Menezes *et al.*,2015).

Sin embargo, en el presente trabajo no se encontraron transcritos diferencialmente expresados relacionados con vías gluconeogénicas que permitieran inferir que se estaba llevando a cabo la formación de glucosa a partir de sustratos no glucídicos como el glicerol. Por otro lado, se pudieron identificar genes que están relacionados con la formación y utilización de ácidos grasos provenientes de la lipólisis. Para que los ácidos grasos libres provenientes de la lipólisis puedan ser oxidados, tienen que ser activados en el citosol por la enzima Acil-CoA sintetasa (CG9009) de la cual se encuentra sobre regulado su transcrito en el músculo aductor. Una vez que los ácidos grasos son activados estos tienen que ser transportados a la mitocondria para su utilización en la Beta oxidación.

Los resultados obtenidos con los microarreglos heterólogos nos permiten inferir que los organismos de *N. subnodosus* que están siendo sometidos a estrés nutricional, están utilizando los triglicéridos como fuente de energía, debido posiblemente a que ya había hecho uso de sus reservas de glucógeno, y al estar sometidos a baja concentración de alimento hace uso de su reservas para la obtención de energía.

8.7 Cuantificación por qPCR de las posibles variantes de la *miostatina* en *N. subnodosus*

La presencia de una secuencia de la *miostatina* en *N. subnodosus* con una deleción nos ha permitido inferir que existen transcritos alternos de este gen en la almeja mano de león. Para poder cuantificar estas posibles variantes del gen, se diseñaron cebadores que permitieran la amplificación de transcritos que tuvieran la deleción, pero que también amplificarán los transcritos sin deleción. Hasta el momento, los análisis de cuantificación de la *miostatina* discutidos en esta sección se han realizado con los cebadores que sólo amplifican los transcritos completos sin deleción. El resultado esperado al utilizar los cebadores que amplificarían todas las posibles variantes de la *miostatina* en *N. subnodosus*, era observar una mayor expresión de la *miostatina* que con los cebadores que solo amplifican variantes sin deleción en cada uno de los tejidos y experimentos analizados. Sin embargo, no sucede así en todos los casos. En el análisis de expresión temporal de la *miostatina* en músculo aductor sólo se puede observar una mayor expresión en junio y agosto de 2009 con este par de cebadores. Adicionalmente, en el análisis de ubicuidad realizado en este mismo sitio, se observó solo una mayor expresión de este par de cebadores en manto y branquia. Por otro lado, la cuantificación en los experimentos de estrés nutricional realizados muestra resultados diferentes. En el primer experimento el tejido que muestra una mayor expresión con estos cebadores es la gónada, mientras que en el segundo experimento son el manto seguido del músculo aductor. Sin embargo, en el análisis de expresión temporal de la *miostatina* en diferentes tejidos de la almeja realizada en Rancho Bueno, sólo se observa una mayor expresión en manto y en

branquia. Como ya describimos anteriormente en diferentes especies ya se han identificado transcritos alternos de la *miostatina*, que debido al splicing alternativo, presentan un codón de paro en la secuencia codificante y son proteínas truncas que pierden el sitio de procesamiento proteolítico RXXR y el ligando activo al extremo C-terminal (Marchitelli *et al.*,2003; Garikipati *et al.*,2007; Covi *et al.*,2008; Huang *et al.*,2011; Jeanplong *et al.*,2013). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran secuencias que pierden el sitio de procesamiento proteolítico debido al splicing alternativo que resulta en 'una delección' en la secuencia del transcrito tanto en gónada como músculo y glándula digestiva, con la presencia de codones de paro prematuros, pero hasta el momento no se han podido obtener estas secuencias en otros tejidos como manto y branquias.

Recientemente Jeanplong *et al.* (2015) han asociado la expresión de una variante de la *miostatina* descrita en *Ovis aries* con bajos niveles de nutrición. Esta variante se une a la *miostatina* antagonizando su actividad biológica e incrementando la diferenciación de los mioblastos (Jeanplong *et al.*, 2013). Bajo condiciones de desnutrición la variante de este gen es diferencialmente regulada, como un mecanismo de protección contra la inhibición del crecimiento y los efectos de la atrofia en el músculo. Dada esta nueva información, es posible inferir que la expresión de las posibles variantes de la *miostatina* en *N. subnodosus* son tejido específica, y se van a expresar bajo condiciones de estrés, como es la disponibilidad de alimento que ha sido evaluada en el presente trabajo.

9. CONCLUSIONES

- La *miostatina/gdf-11* de *Nodipecten subnodosus* está involucrada con la regulación del crecimiento del músculo aductor en la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* como sucede en vertebrados.
- La expresión diferencial de la *miostatina/gdf-11* en los diferentes tejidos de *Nodipecten subnodosus* a lo largo de un ciclo de crecimiento, mostrando una alta expresión en otros tejidos que no son el músculo aductor, como el manto y las branquias, indican un posible rol distinto al crecimiento muscular en este tipo de tejidos.
- En condiciones experimentales de estrés nutricional la expresión de la *miostatina/gdf-11* no incrementa sustancialmente en músculo aductor, presuntamente como mantenimiento de la homeostasis y protección de las fibras musculares durante la etapa de baja alimentación.
- Los microarreglos heterólogos permiten identificar las rutas metabólicas en *Nodipecten subnodosus* que son afectadas por el estrés nutricional, a través de la hibridación de genes ortólogos de una especie modelo como *Drosophila melanogaster*, haciendo de esta una herramienta útil cuando no existen las necesarias en especies no modelo.

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.
- Addadi, L., D. Joester, F. Nudelman y S. Weiner. 2006. Mollusk shell formation: A source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chem. Eur. J.* 12:980-987.
- Akiyama, T., G. Marqués y K. A. Wharton. 2012. A large bioactive BMP ligand with distinct signaling properties is produced by alternative proconvertase processing. *Science Signaling* 5:ra28.
- Allen, D. L. y A. S. Loh. 2011. Posttranscriptional mechanisms involving microRNA-27a and b contribute to fast-specific and glucocorticoid-mediated myostatin expression in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300:C124-C137.
- 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.
- Amali, A. A., C. J-F. Lin, Y-H Chen, W-L Wang, H-Y Gong, C-Y Lee, Y-L Ko, J-K Lu, G. M. Her, T. T. Chen y J-L Wu. 2004. Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1. *Dev Dynam.* 229:847-856.
- Amirouche, A., A-C Durieux, S. Banzet, N. Koulmann, R. Bonnefoy, C. Mouret, X. Bigard, A. Peinnequin y D. Freyssenet. 2009. Down-Regulation of Akt/Mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Growth Fac-Cytokines* 150(1):286-294
- Amores, A., A. Force, Y. L. Yan, C. Amemiya, A. Fritz, R. K. Ho, J. Langeland, V. Prince, Y. L. Wang, M. Westerfield, M. Ekker y J. H. Postlethwait. 1998. Zebrafish hox cluster and vertebrate genome evolution. *Science* 282: 1711-1714.
- Andersen, C. L., J. L. Jensen y C. Gundersen. 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res.* 64:5245-5250.
- Arellano-Martínez, M. B. P. Ceballos-Vázquez, M. Villalejo-Fuerte, F. García-Domínguez, J. F. Elorduy-Garay, a. Esliman-Salgado y I.S. Racotta. 2004a. Reproduction of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*

- Sowerby, 1835 (Bivalvia:Pectinidae) from Laguna Ojo de Liebre, B. C. S., Mexico. *J. Shellfish Res.* 23(3):723-729
- Arellano-Martínez, M., B. P., Ceballos-Vázquez, C. Ruíz-Verdugo, E. Pérez de León, R. Cervantes-Duarte y P. M. Domínguez-Valdéz. 2011. Growth and reproduction of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in a suspended culture System at Guerrero Negro lagoon, Baja California Sur, Mexico. *Aquaculture Res.* 42:571-582
- Arellano-Martínez, M., I. S. Racotta, B. P. Ceballos-Vazquez y J. F. Elorduy-Garay. 2004b. 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* 23:15-23.
- Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp y T. Schwede. 2005. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22(2):195-201.
- Audino, J. A., J. E. A. R. Marian, A. Wanninger y S. G. B. C. Lopes. 2015. Mantle margin morphogenesis in *Nodipecten nodosus* (Mollusca: Bivalvia): new insights into the development and the roles of bivalve pallial folds. *BMC developmental biology* 15(1):22.
- Bagnaresi, P. A. Moschella, O. Beretta, F. Vitulli, P. Ranalli y P. Perata. 2008. Heterologous microarray experiments allow the identification of the early events associated with potato tuber cold sweetening. *BMC Genomics* 9:176
- 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 ¹⁴C incorporation. *Biol Bull* 168:39-49.
- Barber, B. J. y N. J. Blake. 1991. Reproductive physiology. In: Shumway, S.E. editor. *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. New York: Elsevier Science. p. 377-428.
- Barbosa, C., I. Peixeiro y L. Romão. 2013. Gene expression regulation by Upstream Open Reading Frames and human disease. *PLoS Genet.* 9:e1003529.
- Barnes, H. y J. Blackstock. 1973. Detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for "total" lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12:103.118.
- Barrios-Ruíz, D., J. Chávez-Villalba y C. Cáceres-Martínez. 2003. Growth of *Nodipecten subnodosus* (Bivalvia: Pectinidae) in La Paz Bay, Mexico. *Aquaculture Res.* 34:633-639.

- Bassett, C. L., M. L. Nickerson, Jr. R. E. Farrel y M. Harrison. 2004. Molecular transcripts of a gene for a leucine-rich repeat receptor kinase from morning glory (*Ipomoea nil*) originate from different TATA boxes in a tissue-specific manner. *Mol Gen Genomics* 271:752-760.
- Bassett, C.L., M. E. Wisniewski, T. S. Artlip, G. Richart, J. L. Norelli y R. E. Jr. Farrell Jr. 2009. Comparative expression and transcript initiation of three peach dehydrin genes. *Planta* 230:107-118.
- Beltrán-Lugo, A. I., A. N. Maeda-Martínez. R. Pacheco-Aguilar y H. G. Nolasco-Soria. 2006. Seasonal variation in chemical, physical, textural, and microstructural properties of adductor muscles of Pacific lion's-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*). *Aquaculture* 258(1-4):619-632.
- Bendif, E. M., I. Probert, D. C. Schroeder y C. de Vargas. 2013. On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and the transfer of *Dicrateria* to the Prymnesiales (Haptophyta). *J. Appl. Phycol.* 25(6):1763-1776.
- Biga, P.R., S. B. Roberts, D. B. Iliev, L. A. McCauley, J. S. Moon, P. Collodi F. W. Goetz. 2005. The isolation, characterization, and expression of a novel *GDF11* gene and a second myostatin form in zebrafish, *Danio rerio*. *Comp. Biochem. Phys. B Biochem Mol Biol* 141:218-30
- Blicher, M. E., S. Rysgaard y M. K. Sejr. 2010. Seasonal growth variation in *Chlamys islandica* (Bivalvia) from sub-Arctic Greenland is linked to food availability and temperature. *Mar Ecol Prog Ser* 407:71-86.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bradley, L., P. J. Yaworsky y F. S. Walsh. 2008. Myostatin as a therapeutic target for musculoskeletal disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 65:2119-2124.
- Bustin, S.A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. 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* 55:611–622.
- Bustin, S.A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. 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* 55:611–622.
- Cannuel, R., P. G. Beninger, H. McCombie and P. Boudry. Gill development and its functional and evolutionary implications in the blue mussel *Mytilus edulis* (Bivalvia: Mytilidae). *Biol. Bull.* 217:173:188.
- Carneiro, I., T. González, M. López, R. Señarís, J. Devesa y V. M. Arce. 2013. Myostatin expression is regulated by under feeding and neonatal programming in rats. *J. Physiol. Biochem.* 69:15-23.

- Castelhano-Barbosa, E. C., J. E. Gabriel, L. E. Alvares, C. B. Monteiro-Vitorello y L. L. Coutinho. 2005. Temporal and spatial expression of the myostatin gene during chicken embryo development. *Growth Dev. Aging* 69, 3-12
- Chang, T. C., A. Yamashita, C-YA. Chen, Y. Yamashita, W. Zhu, S. Durdan, A, Kahvejian, N. Sonenberg y A-B. Shyu. 2004. UNR, a new partner of poly(A)-binding protein, plays a key role in translational coupled mRNA turnover mediated by the *c-fos* major coding-region determinant. *Genes Dev* 18:2010-2023.
- Chauvigné, F., J. C. Gabillard, C. Weil y P. Y. Rescan. 2003. Effect of refeeding on IGF1, IGFII, IGF receptors, FGF2, FGF6, and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle. *Gen. Comp. Endocr.* 132:209-215.
- Cheadle, C., M. P. Vawter, W. J. Freee y K. G. Becker. 2003. Analysis of microarray data using Z score transformation. *J. Mol. Diagn.* 5(2):73-81
- 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. *J. Biochem & Cell Biol.* 42:2072-2081.
- Chiu, C-S., N. Peekhaus, H. Weber, S. Adamski, E. M. Murray, H. Z. Zhang. J. Z. Zhao, R. Ernst, J. Lineberger, L. Huang, R. Hampton, B. A. Arnold, S. Vitelli, L. Hamuro, W-R. Wang, N. Wei, G. M. Dillon, J. Miao, S. E. Alves, H. Glantsching, F. Wang y H. A. Wilkinson. 2013. Increased muscle force production and bone mineral density in ActRIIB-Fc-Treated mature rodents. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 68(10):1181-1192.
- Christophersen, G. y Ø. Strand. 2002. Effect of reduced salinity on the great scallop (*Pecten maximus*) spat at two rearing temperatures. *Aquaculture* 215:79-92.
- Clop, A., F. Marcq, H. Takeda, D. Pirottin, X. Tordoir, B. Bibé, J. Bouix, F. Caiment, J-M Elsen, F. Eychenne, C. Larzul, E. Laville, F. Meish, D. Milenkovic, J. Tobin, C. Charlier y M Georges. 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet* 38:813-818.
- 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. *The Journal of Experimental Biology* 213: 172-183.
- 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*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 150, 423-430.

- Covi, J.A., H. W. Kim, D. L. Mykles. 2008. Expression of alternatively spliced transcripts for a myostatin-like protein in the blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*. *Comp Biochem Physiol A* 150:423-430.
- Cui, Y., R. Hackenmiller, L. Berg, F. Jean, T. Nakayama, G. Thomas y J. L. Christian. 2001. The activity and signaling range of mature BMP-4 is regulated by sequential cleavage at two sites within the prodomain of the precursor. *Gene Dev* 15:2797-2802.
- Dall'Olio, S., L. Fontanesi, L. N. Costa, M. Tassinari, L. Minieri y A. Falschini. 2010. Analysis of horse myostatin gene and identification of single nucleotide polymorphisms in breeds of different morphological types. *J. Biomed. Biotech*. Doi:10.1155/2010/542945
- Darby, B. J., K. Jones, D. Wheeler y M. A. Herman. 2011. Normalization and centering of array-based heterologous genome hybridization based on divergent control probes. *BMC Bioinformatics* (12):183.
- De las Heras-Saldaña, S. 2012. Evaluación del desempeño reproductivo a través de la expresión de los genes *Cg-Fox12*, *OyVlg*, *og-TGF-Beta* y *vtg* en diferentes cruzas de *Crassostrea gigas* sometidas a diferentes temperaturas. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 152 pp.
- De Santis, C. y D. R. Jerry. 2011b. Differential tissue-regulation of myostatin genes in the teleost fish *Lates calcarifer* in response to fasting. Evidence for functional differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 355:158-165.
- De Santis, C., N. M. Wade, D. R. Jerry, N. P. Preston, B. D. Glecross y M. J. Sellars. 2011a. Growing backwards: an inverted role for the shrimp ortholog of vertebrate myostatin and GDF11. *J. Exp. Biol.* 214:2671-2677.
- Degnin, C., F. Jean, G. Thomas y J. L. Christian. 2004. Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4. *Mol. Biol. Cell*
- Demontis, F., R. Piccirillo, A. L. Goldberg y N. Perrimon. 2013. The influence of skeletal muscle on systemic aging and lifespan. *Aging Cell* 12:943-949.
- Devlin, T. M. 2011. Textbook of Biochemistry: with clinical correlations. 7th edition. Wiley & Sons. USA. 1204 p.
- Duckert P, S. Brunak y N. Blom. 2004. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Eng Des Sel* 17:107-112.
- Durieux, A-C., A. Amirouche, S. Banzet, N. Koulmann, R. Bonnefoy, M. Padeloup, C. Mouret, X. Bigard, A. Peinnequin y D. Freyssenet. 2007. Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. *Endocrinology* 148:3140-3147.

- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5):1792-1797.
- Elkasrawy, M. N. y M. W. Hamrick. 2010. Myostatin (GDF-8) as a key factor linking muscle mass and skeletal form. *J. Musculoskelet Neuronal Interact.* 10(1):56-63.
- Elkina, Y., S. von Hachling, S. D. Anker y J. Springer. 2011. The role of myostatin in muscle wasting: an overview. *J. Cachexia Sarcopenia muscle* 2:143-151.
- Elliot, B. D. Renshaw, S. Getting y R. Mackenzie. 2012. The central rol of myostatin in skeletal muscle and whole body homeostasis. *Acta Physiol.* 205:324-340.
- 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* (Lamarck). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 212:113-136.
- Estrada, N., C. Rodríguez-Jaramillo, F. Ascencio y G. Contreras. 2011. Histología y citología de los epitelios. En: Maeda-Martínez, A. N. y C. Lodeiros-Seijo. Editores. *Biología y cultivo de los moluscos pectínidos del género Nodipecten*. Limusa; Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. 59-76 p.
- Farrell, Jr., R. E. y C. L. Bassett. 2007. Multiple transcript initiation as a mechanism for regulating gene expression. In: Bassett CL, editor. *Regulation of Gene Expression in Plants*. US: Springer. 39-66 p.
- Félix-Pico, E. F., M. Villalejo-Fuerte, A. Tripp-Quezada y O. Holguín-Quiñones. 1999. Growth and survival of *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1835) in suspended culture at the national marine park of Bahía de Loreto, B. C. S. México. In: Strand, Ø. editor. *Book of Abstracts 12th International Pectinid Workshop*, Bergen, Norway. 39-40 p.
- Fleury, E., C. Fabioux, C. Lelong, P. Favrel y A. Huvet. 2008. Characterization of a gonad-specific transforming growth factor-Beta superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Gene* 410(1): 187-196
- Freites-Valbuena, L. F., J. M. Mazón-Suástegui, A. N. Maeda-Martínez, V. Koch, M. Osuna-García, C. A. Ruíz-Verdugo, F. A. García-Domínguez, J. P. de la Roche, G. Manzoni, G. S. Rupp y C. Lodeiros-Seijo. 2011. Preengorde, cultivo intermedio y engorde de los pectínidos *Nodipecten nodosus* y *N. subnodosus*. En: Maeda, A. N., C. y Lodeiros-Seijo, editores. *Biología y Cultivo de los moluscos pectínidos del género Nodipecten*. México: Limusa. 313-321 p.
- Fritsch, C., A. Sawala, R. Harris, A. Maartens, C. Sutcliffe, H. L. Ashe y R. P. Ray. 2012. Different requirements for proteolytic processing of bone morphogenetic protein 5/6/7/8 ligands in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 287:5942-5953.

- Funkenstein, B. y Y. Rebhan. 2007. Expresión, purificación, renaturación and activation of fish myostatin expressed in *Escherichia coli*: Facilitation of refolding and activity inhibition by myostatin prodomain. *Protein Express. Purif.* 54: 54-65.
- Gabillard, J-C., P. R. Bigga, P-Y. Rescan e I. Seilliez. 2013. Revisiting the paradigm of myostatin in vertebrates: Insights from fishes. *Gen. Comp. Endocr.* 194:45-54.
- Galhardo, M., L. Sinkkonen, P. Berninger, J. Lin, T. Sauter y M. Heinäniemi 2014. Integrated analysis of transcript-level regulation of metabolism reveals disease-relevant nodes of the human metabolic network. *Nucleic Acids Res* 42:1474-1496.
- Gálvez-Gastélum, F. J., A. S. Sandoval-Rodríguez y J. Armendáriz-Borunda. 2004. El factor de crecimiento transformante β como blanco terapéutico. *Salud Pública de México.* 46(4): 341-350.
- Gamer, L. W., K. A. Cox, C. Small y V. Rosen. 2001. *Gdf11* is a negative regulator of chondrogenesis and myogenesis in the developing chick limb. *Dev. Biol.* 229:407-420.
- Garikipati, D. K., S. A. Gahr y B. D. Rodgers. 2006. Identification, characterization and quantitative expression analysis of rainbow trout myostatin-1a and myostatin-1b genes. *J Endocrinol.* 190:879-888.
- Garikipati, D. K., S. A. Gahr, E. H. Roalson y B. D. Rodgers. 2007. Characterization of rainbow trout myostatin-2 genes (rtMIOSTATINA-2a and 2b): Genomic organization, differential expression, and pseudogenization. *Endocrinol.* 148(5):2106-2115.
- 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.
- Gosling, E. 2004. Reproduction, settlement and recruitment, 131-168. En: E, Gosling, editor. *Bivalves Mollusks. Biology, Ecology and Culture.* Oxford: Elsevier
- Grace, M. L., M. B. Chandrasekharan, T. C. Hall y A. J. Crowe. 2004. Sequence and spacing of TATA box elements are critical for accurate initiation from the β -Phaseolin promoter. *J Biol Chem* 279:8102-8110.
- Gracey, A. Y. y A. R. Cossins. 2003. Application of microarray technology in environmental and comparative physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 65:231-259.

- Gray, A. M. y A. J. Mason. 1990. Requirement for activin A and transforming growth factor-beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* 247: 1328-1330.
- Gray, N. K. y M. Wickens. 1998. Control of translation initiation in animals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:399-458.
- Guernec, A., B. Chevalier y M. J. Duclos. 2004. Nutrient supply enhances both IGF-I and MSTN mRNA levels in chicken skeletal muscle. *Domest. Anim. Endocrin.*
- Guo T, Jou W, Chanturiya T, Portas J, Gavrilova O, McPherron AC. 2009. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. *PLoS ONE* 4:e4937.
- Guo, L., L. Li, S. Zhang y G. Zhang. 2012. Molecular cloning and characterization of the myostatin gene in a cultivated variety of bay scallop *Argopecten irradians*. *Aquaculture* 350:192-199.
- 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.
- Hamrick, M. W. 2003. Increased bone mineral density in the femora of GDF-8 knockout mice. *Anat. Rec.* 272A:388-391.
- Hellemans, J., G. Mortier, A. De Paepe, F. Speleman y J. Vandesompele. 2007. *qBase* relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8:R19.
- Hendrickx, E. M., R. C. Brusca y L. T. Findley. 2005. The Sea of Cortes. En: Hendrickx EM, Brusca RC, Findley LT. editors. A Distributional Checklist of the Macrofauna of the Gulf of California, Mexico. Part I: Invertebrates. Tucson, AR:Arizona-Sonora Desert Museum. 1-24 p.
- 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.
- Hinnebusch, A.G. 2005. Translational regulation of *GCN4* and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* 59:407-50.
- Hornick, J. L., C. Van Eenaeme, O. Gérard, I. Dufrasne y L. Istasse. 2000. Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domest. Anim Endocrin.* 19(2):121-132.
- 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). *Genes & Genetic System* 85: 207-218.

- Huang, K., J. Wang, C. Han, H. Liu, L. Li, F. Dai, Z. Pan, F. Xu, H. He y H. Xu. 2011. Developmental expression and alternative splicing of the duck myostatin gene. *Comp. Biochem. Phys. D.* 6(3): 238-243.
- Huang, Z., X. Chen, B. Yu, J. He y D. Chen. 2012. MicroRNA-27a promotes myoblast proliferation by targeting myostatin. *Biochem Bioph Res Co* 423:265-269.
- Humason GL. 1979. Hematoxylin staining. *Animal tissue techniques*. Emerson R, Kennedy D, Park RB, Beadle GW, Witaker DM. San Francisco, CA: WH Freeman and Co. p 111-131.
- Ibarra, A. M., J. L. Petersen, T. R. Famula y B. May. 2006. Charaterization of 35 microsatellite loci in the Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and their cros-species amplification in four other scallops of the Pectinidae family. *Mol Ecol Notes* 6:153-156.
- Ibarrola, I., E. Navarro y M. B. Urrutia. 2000. Acute and acclimated digestive responses of the cockle *Cerastoderma edula* (L.) to changes in food quality and quantity. I. Feeding and absorption of biochemical components. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 252:181-198.
- Ibarrola, I., M. Etxeberria, J. I. P. Iglesias, M. B. Urrutia y E. Angulo. 2000a. Acute and acclimated digestive responses of the cockle *Cerastoderma edula* (L.) to changes in the food quality and quantity. II. Enzymatic, celluar and tissuelar responses of the digestive gland. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 252:199-219.
- Ichimura, A., Y. Ruike, K. Terasawa y G. Tsujimoto. 2011. miRNAs and regulation of cell signaling. *FEBS Journal* 278:1610-1618.
- Jeanplong, F., C. C. Osepchook, S. J. Falconer, H. K. Smith, J. J. Bass, C. D. McMahon y J. M. Oldman. 2015. Undernutrition regulates the expression of a novel splice variant of myostatin and IGF 1 in ovine skeletal muscle. *Domest. Anim. Endocrin.* 52:17-24.
- Jeanplong, F., J. J. Bass, H. K. Smith, S. P. Kirk, R. Kambadur, M. Sharma y J. M. Oldham. 2003. Prolonged underfeeding of sheep increases myostatin and myogenic regulatory factor Myf-5 in skeletal muscle while IGF-I and myogenin are repressed. *J Endocrinol* 176:425-437.
- Jeanplong, F., S. J. Falconer, J. M. Oldham, M. Thomas, T. S. Gray, A. Hennebry, K. G. Matthews, F. C. Kemp, K. Patel, C. Berry, G. Nicholas y C. D. McMahon. 2013. Discovery of a mammalian splice variant of myostatin that stimulates myogenesis. *PLOS One* 8(12): e81713.
- Ji, S, R. L. Losinski, S. G. Cornelius, G. R. Frank, G. M. Willis, D. E. Gerrard, F. Depreux FFS, Spurlock ME. 1998. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation.

- Am J Physiol 275 (Regulatory Integrative Comp Physiol 44):R1265–R1273.
- Jin, H-J., M. A. Dunn, D. Borthakur y Y. S. Kim. 2004. Refolding and purification of unprocessed porcine myostatin expressed in *Escherichia coli*. *Pro. Exp. Pur.* 35:1-10.
- Johansen, K. A. y K. Overturf. 2005. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar Biotechnol* 7:576-587.
- Johansen, K. A. y K. Overturf. 2006. Alterations in expression of genes associated with muscle metabolism and growth during nutritional restriction and refeeding in rainbow trout. *Comp. Biochem. Phys. B* 144:119-127.
- Kahlem P, Newfeld S. J. 2009. Informatics approaches to understanding TGF β pathway regulation. *Development* 136:3729-3740.
- Kanjanaworakul, P., P. Srisapoome, O. Sawatdichaikul y S. Poompuang. 2014. cDNA structure and the effect of fasting on myostatin expression in walking catfish (*Clarias macrocephalus*, Günther 1864). *Fish Physiol. Biochem.* 41:177-191.
- Keen, A. Am. 1971. *Sea Shells of Tropical West America*. Stanford: Stanford University Press, 1064 p.
- Keen, A. M. y E. Coan. 1974. *Marine Molluscan Genera of Western North America: An Illustrated key*. Second Edition. Stanford University Press. 208 pp.
- Kenny NJ, Namigai, EKO, Dearden PK, Hui JHL, Grande C, Shimeld SM. 2014. The Lophotrochozoan TGF- β signaling cassette-diversification and conservation in a key signaling pathway. *Int J Dev. Biol.* 58:533-549.
- Kerr, T., E. H. Roalson y B. D. Rodgers. 2005. Phylogenetic analysis of the myostatin gene sub-family and the differential 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*. *Bioch. Biophys. Acta* 1679: 174-179.
- Kim, H-W., H-J. Kim y M. S. Yoo. 2007. Characterization of a Myostatin-like gene from the scallop *Patinopecten yessoensis*. *J. Fish. Sci. Technol.* 10(1):16-23.
- 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*. *Aquac. Res.* 41(11): e862-e871.

- Kim, K-S., J-M Jeon y H-W, Kim. 2009. A Myostatin-like gene expressed highly in the muscle tissue of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish Aqua Sci* 12(3):185-193.
- Kingsley, D. M. 1994. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Dev.* 8:133-146.
- Koch, V., M. Mazón-Suastegui, F. Sinsel, M. Robles-Mungaray y D. Dunn. 2005. Lion's paw scallop (*Nodipecten subnodosus*, Sowerby 1835) aquaculture in Bahia Magdalena, Mexico: effects of population density and season on juvenile growth and mortality. *Aquaculture Res.* 36:505-512.2009.
- Künnapu, J., I. Björkgren y O. Shimmi. 2009 The *Drosophila* DPP signal is produced by cleavage of its proprotein at evolutionary diversified furin-recognition sites. *PNAS* 106:8501-8506.
- Lai, E.C, B. Tam y G. M. Rubin. 2005. Persuasive regulation of *Drosophila* Notch target gene by GY-box-, Brd-box-, and K-box-class microRNAs. *Genes Dev* 19:1067-1080.
- Lai, E.C., C. Burks y J. W. Posakony. 1998. The K box, a conserved 3'UTR sequence motif, negatively regulates accumulation of *Enhancer of split* Complex transcripts. *Development* 125:4077-4088.
- Larade, K. y K. B. Storey. Living without oxygen: anoxia-responsive gene expression and regulation. *Curr Genet.* 10:76-85
- Le Pennec, M., P. G. Beninger y A. Herry. 1988. New observations of the gills of *Placopecten magellanicus* (Mollusca: Bivalvia), and implications for nutrition. II. Internal anatomy and microanatomy. *Mar. Biol.* 98:229-237.
- Lee, C-Y., S-Y Hu, H-Y Gong, M. H-C. Chen, J-K. Lu y J-L. Wu. 2009. Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 387:766-771.
- Lee, J-H., J. Momani, Y. M. Kim, C-K. Kang, J-H. Choi, H-J. Baek y H-W. Kim. 2015. Effective RNA-silencing strategy of Lv-MSTN/GDF11 gene and its effects on the growth in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Phys. B* 179:9-16.
- Lee, S. J. y A. C. McPherron. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *PNAS.* 98 (16): 9306-9311.
- Lee, S. J. y M. C. McPherron. 1999. Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Curr Opin Genet Dev* 9:604-607.

- Lee-Hoeflich, S. T., X. Zhao, A. Mehra y L. Attisano. 2005. The Drosophila type II receptor, Wishful thinking, binds BMP and myoglianin to activate multiple TGF β family signaling pathways. *FEBS Letters* 579:4615-4621.
- Lewis, B.P., I-H. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel y C. B. Burge. 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115:787-798.
- Li, Q. y Y. Li. 2014. Molecular cloning and single nucleotide polymorphisms identification of myostatin cDNA in the Pearl Oyster, *Pinctada fucata*. *J. World Aquacult. Soc.* 45(6):638-651.
- Lin, J. S., T. F. Lerch, R. W. Cook, T. S. Jardetzky y T. K. Woodruff. 2006. The structural basis of TGF- β , bone morphogenetic protein, and activin ligand binding. *Reproduction* 132:179-190.
- Llera-Herrera, R., A. García-Gasca, A. Huvet y A. M. Ibarra. 2012a. Next-generation sequencing of SSH libraries identifies spermatogenesis gene transcripts differentially expressed in inactive vs. maturing male gonad of the scallop *Nodipecten subnodosus*. *Plant and Animal Genome*, San Diego CA. Enero 14-18.
- Llera-Herrera, R., A. García-Gasca, A. Huvet y A. M. Ibarra. 2012b. Identification of a *tubulin- α* gene specifically expressed in testis and adductor muscle during stable reference gene selection in the hermaphrodite gonad of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Mar Genom* 6:33-44.
- Lo, P. C. H. y M. Frasch. 1999. Sequence and expression of *myoglianin*, a novel *Drosophila* gene of the TGF- β superfamily. *Mech. Develop.* 86:171-175.
- Lodeiros, C. J, J. J. Rengel, H. E. Guderley, O. Nusetti y J. H. Himmelman. 2001. Biochemical composition and energy allocation in the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* during the months leading up to and following the development of gonads. *Aquaculture*. 199:63-72.
- Lodeiros, C. J. y J. H. Himmelman. 2000. Identification of factors affecting growth and survival of the tropical scallop *Euvola (Pecten) ziczac* in the Golfo de Cariaco, Venezuela. *Aquaculture* 182:91-114.
- Lodeiros, C.J., L. Freites, A. Maeda-Martínez y J. H. Himmelman. 2012. Influence of environmental factor on the growth of the juvenile, maturing juvenile, and adult tropical scallop, *Euvola ziczac* (Pteroida: Pectinidae), in suspended culture conditions. *Lat Am J Aquat Res* 40:53-62.
- Luna-Moreno, D., O. Vázquez-Martínez, A. Báez-Ruíz, J. Ramírez y M. Díaz-Muñoz. 2007. Food restricted schedules promote differential lipoperoxidative activity in rat hepatic subcellular fractions. *Comp. Biochem. Phys. A* 146:632-643.

- Maboloc, E. A., S. S. Mingoa-Licuanan y R. D. Villanueva. 2014. Effects of reduced salinity on the heterotrophic feeding of the juvenile Giant Clam *Tridacna gigas*. *J. Shellfish Res.* 33(2):373-379.
- Maccatrozzo, L., L. Bargelloni, B. Cardazzo, G. Rizzo y T. Patarnello. 2001. A novel second myostatin gene is present in teleost fish. *FEBS Letters* 509: 36-40.
- MacLea, K. S., J. A. Covi, H.W, Kim, E. Chao y S. Medler. 2010. Myostatin from the American lobster, *Homomarus americanus*: Cloning and effects of molting on expresión in skeletal muscles. *Comp Bioch and Physiol. A.* 157(4): 328-337.
- MacNicol, M.C., C. E. Cragle y A. M. MacNicol. 2011. Context-dependent regulation of Musashi-mediated mRNA translation and cell cycle regulation. *Cell Cycle* 10:39-44.
- 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.
- Marchitelli, C., M. C. Savarese, A. Crisa, A. Nardone, P. A. Marsan y A. Valentini. 2003. Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codón in the third exón of myostatin gene. *Mamm. Genome* 14:392-395.
- Marin, F., G. Luquet, B. Marie y D. Medakovic. 2008. Molluscan Shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Curr. Top. Dev. Biol.* 80:209-276.
- Martinez, G. 1991. Seasonal variations in biochemical composition of three size classes of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *The Veliger* 34:335-343.
- Martínez, G., K. Brokordt, C. Aguilera, V. Soto y H. Guderley. 2000. Effect of diet and temperatura upon muscle metabolic capacities and biochemical composition of gonad and muscle in *Argopecten purpuratus* Lamarck 1819. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 247:29-49.
- Massagué, J. 1998. *TGF-β* signal transduction. *Ann. Rev. Biochem.* 67 :753-791.
- Mazón-Suástegui, J. M., A.N. Maeda-Martínez, M. Robles-Mungaray, J. P. De la Roche, G. S. Rupp, M. Mendes-De-Bem, L. A. Velasco y L. F. Freitas-Valbuena. 2011. Avances en la producción de juveniles de *Nodipecten spp.* En: Maeda, A. N., C. y Lodeiros-Seijo, editores. *Biología y Cultivo de los moluscos pectínidos del género Nodipecten*. México: Limusa. 275-303 p.

- McFarlane, C., E. Plummer, M. Thomas, A. Hennebry, M. Ashby, N. Ling, H. Smith, M. Sharma y R. Kambadur. 2006. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF- κ B-Independent, FoxO1-Dependent mechanism. *J. Cell. Physiol.* 209:501-514.
- McPherron, A. C. y S. J. Lee. 1996. The transforming growth factor β superfamily. *Growth Fac Cyt Health Dis.* 1B 357-393.
- 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., A. M. Lawler y S-J. Lee. 1999. Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. *Nat. Genet.* 22(3), 260-264.
- McPherron, A. C., Lawler, A. M. y S. J. Lee. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new *TGF- β* superfamily member. *Nature* 387, 83-90.
- McPherron, A. C., T. V. Huynh y S-J. Lee. 2009. Redundancy of myostatin and growth/differentiation factor 11 function. *BMC developmental biology.* 9:24.
- Méndez, G. y W. Wieser. 1993. Metabolic responses to food deprivation and refeeding in juveniles of *Rutilus rutilus* (Teleostei: Cyprinidae). *Environ. Biol. Fish.* 36:73-81.
- Menezes, C., I. Ruiz-Jarabo, J. A. Martos-Sitcha, C. Toni, J. Salbego, A. Becker, V. L. Loro, G. Martínez-Rodríguez, J. M. Mancera y B. Baldisserotto. 2015. The influence of stocking density and food deprivation in silver catfish (*Rhamdia quelen*): A metabolic and endocrine approach. *Aquaculture* 435:257-264.
- Mi, H., A. M., J. T. Casagrande y P. D. Thomas. 2013. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. 8(8):1551-1566.
- Miretti, S., E. Martignani, P. Accornero y M. Baratta. 2013. Functional effect of mir-27b on myostatin expression: a relationship in piedmontese cattle with double-muscléd phenotype. *BMC Genomics* 14:194.
- Mizuta, S., Y. Nakanishi, M. Siraishi, Y. Yokoyama y R. Yoshinaka. 2007. Properties of scallop mantle collagen: its content, tissue distribution and thermal behavior. *Fisheries Sci.* 73:1353-1361.
- Moon, Y. S., H. G. Lee, Y. H. Yin, X. Jin, Z. S. Hong, J. S. Cho, S. C. Kim, S. K. You, D. J. Jin, J. Y. Han y Y. J. Choi. 2005. Effect of maternal passive autoimmunization against myostatin on growth performance in chickens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18, 1017-1021.

- Moor, C. H., H. Meijer y S. Lissenden. 2005. Mechanisms of translational control by the 3'UTR in development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 16:49-58.
- Morales-Collío, K., Valenzuela-Muñoz, V. y C. Gallardo-Escárate. 2014. The myostatin gene of *Argopecten purpuratus* (*ApMSTN*): transcript expression and single-nucleotide polymorphism differences between wild and hatchery-bred populations. *J Mollus Stud* 80:169-176.
- Morales-Hernández, R. y C. Cáceres-Martínez. 1996. Pesquería de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. 87-100. En: Casas-Valdéz, M. y G. Ponce-Díaz, (eds). Estudio del potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur. México. La Paz, B. C. S.: SEMARNAP, Gob. De B.C.S., FAO, UABCS, CICIMAR.IPN, CRIP La Paz.
- Morelos-Castro, R.M. 2011. 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 de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 101 pp.
- Morton, L. y M. J. Keough. 2003. Variation in the response of intertidal infaunal invertebrates to nutrient additions: field manipulations at two sites within Port Phillip Bay, Australia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 250:35-49.
- Mosher, D. S., P. Quignon, C. D. Bustamante, N. B. Sutter, C. S. Mellersh, H. G. Parker y E. A. Ostrander. 2007. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genetics*. 3 (5): 0779-0786.
- Nakashima, M. K. Tachibana, K. Iohara, M. Ito, M. Ishikawa y A. Akamine. 2003. Induction of reparative dentin formation by ultrasound mediated gene delivery of Growth/Differentiation Factor 11. *Hum. Gene Ther.* 14:591-597.
- Nakashima, M., K. Iohara, M. Ishikawa, M. Ito, A. Tomokiyo, T. Tanaka y A. Akamine. 2004. Stimulation of reparative dentin formation by ex vivo gene therapy using dental pulp stem cells electrotransfected with *Growth/differentiation factor 11 (GDF11)*. *Hum. Gene Ther.* 15:1045-1053.
- Nakashima, M., K. Mizunuma, T. Murakami y A. Akamine. 2002. Induction of dental pulp stem cell differentiation into odontoblasts by electroporation-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11 (GDF11). *Gene therapy* 9(12):814-818.
- Nakashima, M., T. Toyono, A. Akamine y A. Joyner. 1999. Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGF β superfamily during mouse embryogenesis. *Mech. Develop.* 80:185-189.

- Nicholson, E. K., S. R. Stock, M. W. Hamrick y M. J. Ravosa. 2006. Biomineralization and adaptative plasticity of the temporomandibular joint in myostatin knockout mice. *Arch. Oral Biol.* 51:37-49.
- Niu, D., L. Wang, Z. Bai, S. Xie, H. Zhao y J. Li. 2014. Identification and expression characterization of the *myostatin* (MSTN) gene and association analysis with growth traits in the razor clam *Sinonovacula constricta*. *Gene* 555(2):297-304.
- Nolan, T. y S. Bustin. 2008. Procedures for quality control of RNA samples for use in quantitative reverse transcription PCR. En: Kerr J.T. y L. Birch, Editores: *Essentials of Nucleic Acid Analysis: a Robust Approach*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. 189-207 p.
- Núñez-Acuña, G. y C. Gallardo-Escárate. 2014. The myostatin gene of *Mytilus chilensis* evidences a high level of polymorphism and ubiquitous transcript expression. *Gene* 536:207-212.
- Ocaño-Higuera, V. M., A. N. Maeda-Martínez, M. E. Lugo-Sánchez, G. García-Sánchez, E. Márquez-Ríos, S. Gómez-Jimenez y R. Pacheco-Aguilar. Effect of emerged shipment on the physiological condition of the adductor muscle in adult giant lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* (Sowerby 1835). *Aquac. Res.* 42:1087-1095.
- Østbye, T-K., T. F. Galloway, c. Nielsen, I. Gabestad, T. Bardal y Ø. Andersen. 2001. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *Eur. J. Biochem.* 268:5249-5257.
- Osuna-Jiménez, I., T. D. Williams, M-J. Prieto-Álamo, N. Abril, J. K. Chipman y C. Pueyo. 2009. Immune- and stress-related transcriptomic responses of *Solea senegalensis* stimulated with lipopolysaccharide and copper sulphate using heterologous cDNA microarrays. *Fish Shellfis Immun.* (26):699-706.
- Ozawa, H, K. Hoshi y N. Amizuka. 2008. Current concepts of bone biomineralization. *J. Oral Biosci.* 50(1):1-14.
- 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(1-2):270-282.
- Palacios, E., I. S. Racotta, Y. Marty, E. Kraffe, J. Moal y J. F. Samain. 2007. Lipid composition of the Pacific lion-paw scallop, *Nodipecten*(*Lyropecten*) *subnodosus*, in relation to gametogenesis. I. Fatty acids, *Aquaculture* 250:95-101
- Patel, V. K. y F. Demontis. 2014. GDF11/Myostatin and aging. *Aging* 6(5):351-352.

- Paulsson, M. 1992. Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* 27(1/2):93-127.
- Pedersen, B. K. 2011. Muscles and their myokines. *J. Exp. Biol.* 214:337-346.
- 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.
- Petersen, J. L., M. R. Baerwald, A. M. Ibarra y B. May. 2012. A first-generation linkage map of the Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*): Initial evidence of QTL for size traits and markers linked to orange shell color. *359-353:200-209*
- Petersen, J.L., A. M Ibarra, J. L., Ramirez, y B. May. 2008. An induced mass spawn of the hermaphroditic lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*: genetic assignment of maternal and paternal parentage. *J. Hered.* 99, 337–348.
- Petersen, J.L., M. R. Baerwald, A. M. Ibarra y B. May. 2009. Discovering QTL's underlying growth traits in the Pacific lion-paw scallop using a first generation microsatellite and AFLP linkage map. Plant & Animal Genome XVII Conference. January 10–14, 2009, San Diego California. Abstract.
- Pfaffl, M. W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. En: Bustin, S, editor. *AZ of quantitative PCR*. La Jolla, CA: International University Line. 87–112 p
- Pfaffl, M. W., A. Tichopad, C. Prgomet y T. P. Neuvians. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26:509-515.
- Phillips, R. y P. Ráb. 2001. Chromosome evolution in the Salmonidae. 2001. *Biol. Rev.* 76:1-25.
- Ponce-Díaz, G., A. Massó-Rojas, E. F. Félix-Pico, M. V. Morales-Zárate, N. García, C. Lodeiros-Seijo y S. E. Lluch-Cota. 2011. *Nodipecten spp.* Como recurso pesquero. En: Maeda, A. N., C. y Lodeiros-Seijo, editores. *Biología y Cultivo de los moluscos pectínidos del género Nodipecten*. México: Limusa. 11-26 p.
- Postlethwait, J. H., Y. L. Yan, M. A. Gates, S. Horne, A. Amores, A. Brownlie, A. Donovan, E. S. Egan, Z. Gong, C. Goutel, A. Fritz, R. Kelsh, E. Knapik, E. Liao, B. Paw, D. Ransom, A. Singer, M. Thomson, T. S. Abduljabbar, P. Yelick, D. Beier, J. S. Joly, D. Larhammar, F. Rosa, M. Westerfield, L. I. Zon, S. L. Johnson y W. S. Talbot. 1998. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nature* 18:345-349.

- Puig, O. y R. Tjian. 2006. Nutrient availability and growth, Regulation of insulin signaling by dFOXO/FOXO1. 5(5): 503-505.
- Qian Z, Mi X, Wang X, He S, Liu Y, Hou F, Liu Q, Liu X. 2013. cDNA cloning and expression analysis of myostatin/GDF11 in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comp Biochem Phys A* 165:30-39.
- 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 hypothesis for the lack of advantage in triploid mollusc's growth in food-rich environments. *Mar Biol* 153:1245-1256
- Racotta, I. S., J. L. Ramírez, A. M. Ibarra, M. C. Rodríguez-Jaramillo, D. Carreño y E. Palacios. 2003. Growth and gametogénesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. *Aquaculture* 217:335-349
- Radaelli, G., A. Rowlerson, F. Mascarello, M. Patrono y B. Funkenstein. 2003. Myostatin precursor is present in several tissues in teleost fish: a comparative immunolocalization study. *Cell. Tissue Res.* 311:239-250.
- 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 drip system. *Aquaculture Eng.* 20: 175-189.
- Ramírez-Arce, J. 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.
- Ravosa, M. J., E. B. Klopp, J. Pinchoff, S. R. Stock y M. W. Hamrick. 2007. Plasticity of mandibular biomineralization in myostatin-deficient mice. *J. Morphol.* 268:275-282.
- Rhee, H.S. y B. F. Pugh. 2012. Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature* 483:295-301.
- Ririe, K. M., R. P. Rasmussen y C. T. Wittwe. 1997. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Anal Biochem.* 245(2):154-160.
- Rodgers, B. D. G. M. Weber, K. M. Kelley 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 evolutionary biology of myostatin: a comparative review. *Endocrine Reviews* 29(5):513-534.

- Rodgers, B. D., G. M. Weber, C. V. Sullivan y M. A. Levine. 2001. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology* 142(4):1412-1418.
- Roldán-Carrillo, L. M., A. N. Maeda-Martínez, A. Massó-Rojas y M. T. Sicard-González. 2005. Salinity tolerance and resistance of the pacific lion's paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and the relationships with species distribution and density in a coastal lagoon. *J Shellfish Res.* 24(2):353-361.
- Saharinen, J., J. Taipale y J. Keski-Oja. 1996. Association of the small latent transforming growth factor- β with an eight cysteine repeat of its binding proteina *LTBP-1*. *EMBOJ.* 15 (2): 254-253.
- Sambrook, J. y D. W. Russell. Molecular cloning: A Laboratory manual, Volumen 1. CSHL Press. 2344 pp.
- Sánchez-Paz, A., J. G. Soñanez-Organis, A. B. Peregrino-Uriarte, A. Muhlia-Almazán y G. Yepiz-Plascencia. 2008. Response of the phosphofructokinase and pyruvate kinase genes expressed in the midgut gland of the Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* during short-term starvation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 362:79-89.
- Sandri, M. 2008. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology* 23:160-170.
- Sauer, M. P. Branduardi, B. Gasser y M. Valli. 2004. Differential gene expression in recombinant *Pichia pastoris* analysed by heterologous DNA microarray hybridisation. *Microl. Cell. Fact.* (3): 17.
- Sayed, D. y M. Abdellatif. 2011. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev* 91:827-887.
- Schilling, T. F., T. Piotrowski, H. Grandel, M. Brand, C-P. Heisenberg, Y-J. Jiang, D. Beuchle, M. Hammerschmidt, D. A. Kane, M. C. Mullins, F. J. M. van Eeden, R. N. Kelsh, M. Furutani-Seiki, M. Granato, P. Haffter, J. Odenthal, R. M. Warga, T. Trowe y C. Nüsslein-Volhard. 1996. Jaw and branchial arch mutants in zebrafish I: branchial arches. *Development* 123:329-344.
- Shaw BL, Batle HI. 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tracto of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can J Zool* 35:325-346.
- Shen, W., G. Ren, Y. Zhu y X. Zhang. 2015. Characterization of MSTN/GDF11 gene from shrimp *Macrobrachium nipponense* and its expression profiles during molt cycle and after eyestalk ablation. *Genes Genom.* 37(5): 441-449.

- Shen, X. R., H. Kurihara y K. Takahashi. 2007. Characterization of molecular species of collagen in scallop mantle. *Food Chem.* 102:1187-1191.
- Silver, N., S. Best, J. Jiang y S. L. Thein. 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC molecular biology* 7:33.
- Sivaramakrishna, B. y K. Radhakrishnaiah. 2000. Mercury induced alteration in the energetics of hepatopancreas of two freshwater molluscs, *Pila globosa* and *Lamellidens marginalis*. *Trace metals in the Environment* 4: 389-409.
- Sopory, S., S. Kwon, M. Wehrili y J. L. Christian. 2010. Regulation of Dpp activity by tissue-specific cleavage of an upstream site within the prodomain. *Dev Biol* 346:102-112.
- Spriggs, K. A., M. Bushell y A. E. Willis. 2010. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell* 40:228-237.
- Stinckens, A., T. Luyten, J. Bijttebier, K. Van den Maagdenberg, D. Dieltiens, S. Janssens, S. De Smet, M. Georges y N. Buys. 2008. Characterization of the complete porcine *MSTN* gene and expresión levels in pig breeds differing in muscularity. *Anim. Genet.* 39(6):586-596.
- Storey, K. B. 1987. Mechanisms of glycolytic control during facultative anaerobiosis in a marine mollusk; tissue-specific analysis of glycogen phosphorylase and fructose-2.6-biphosphate. *Can. J. Zool.* 66(8):1767-1771.
- Struhl, K. 1986. Constitutive and inducible *Saccharomyces cerevisiae* promoters: evidence for two distinct molecular mechanisms. *Moll Cell Biol.* 6:3847-3853.
- Sweijd, N. A., R. Bowie, A. L. Lopata, A. M. Marinaki, E. H. Harley y P. A. Cook. 1998. A PCR technique for forensic, species-level identification of Abalone tissue. *J Shellfish Res.* 17: 889-895.
- Szostak, E. y F. Gebauer. 2012. Translational control by 3'-UTR-binding proteins. *Brief. Func. Genomics* 12:58-65.
- Talavera, G. y J. Castresana. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.* 56(4):564-577.
- Tamura K, G. Stecher, D. Peterson, A. Fikipski y S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12):2725-2729.
- 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.). *Domest Anim Endocrin* 30:304-319.

- Thomas, M., B. Langley, C. Berry, M. Sharma, S. Kirk y J. Bass. 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J.Biol. Chem.* 275 (51): 40235-40243.
- Trendelenburg, A. U., A. Meyer, D. Rohner, J. Boyle, S. Hatakeyama y D. J. Glass. 2009. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol Cell Physiol* 296:C1258-C1270.
- Urbich, C., D. Kaluza, T. Frömel, A. Knau, K. Bennewitz, R. A. Boon, A. Bonauer, C. Doebele, J-N Boeckel, E. Hergenreider, A. M. Zeiher, J. Kroll, I. Fleming y S. Dimmeler. 2012. MicroRNA-27a/b controls endothelial cell repulsion and angiogenesis by targeting semaphoring 6A. *Blood* 119:1607-1616.
- Van Handel, E. 1964. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal. Biochem.* 11(2):256-265.
- Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley y C. B. Thompson. 2009. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324(5930):1020-1033.
- Vandesompele, J., K. De 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 Biol.* 3(7): doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- Viegas, I., A. Caballero-Solares, J. Rito, M. Giralt, M. A. Pardal, I. Metón, J. G. Jones y I. V. Baanante. Expressional regulation of key hepatic enzymes of intermediary metabolism in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) during food deprivation and refeeding. *Comp. Biochem. Phys. A* 174:38-44.
- Vitt, U. A., S. Y. Hsu y A. J. W. Hsueh. 2001. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol. Endocrinol.* 15(5): 681-694.
- Wang, J., D. Duncan, Z. Shi y B. Zhang. 2013. WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res.* 41:W77-W83.
- Wang, M. y A. Marín. 2006. Characterization and prediction of Alternative Splice Sites. *Gene.* 366:219-227.
- Wethmar, K., J. J. Smink y A. Leutz. 2010. Upstream open reading frames: Molecular switches in (patho)physiology. *Bioessays* 32:885–893.
- Wolfman, N. M., 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. *PNAS* 100(26):15842-15846.

- Wunderink, Y. S., G. Martínez-Rodríguez, M. Yúfera, I. Martín-Montero, G. Flik, J. M. Mancera y P. H. M. Klaren. 2012. Food deprivation induces chronic stress and effects thyroid hormone metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) post-larvae. *Comp. Biochem. Phys. A* 162(4):317-322.
- Xing, F., X. Tan, P.-J. Zhang, J. Ma, Y. Zhang, P. Xu y Y. Xu. 2007. Characterization of amphioxus *GDF8/11* gene, an archetype of vertebrate *MSTN* and *GDF11*. *Dev. Genes Evol.* 217:549-554.
- Xu, C., G. Wu, Y. Zohar y S.-J. Du. 2003. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *J. Exp. Biol.* 206:4067-4079.
- Yamada, M., A. Ozawa, S. Ishii, N. Shibusawa, T. Hashida, T. Ishizuka, T. Hosoya, T. Monden, T. Satoh y M. Mori. 2001. Isolation and characterization of the rat prolactin-releasing peptide gene: Multiple TATA boxes in the promoter region. *Biochem Biophys Res Commun* 281:53-56.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Prentice Hall, New Jersey.

11. ANEXOS

Anexo I

Transformación

- 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.

Anexo II

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ARN

(Modificado por De las Heras-Saldaña, 2012)

- 1.- Pesar aprox. 100 mg de tejido y enjuagar con H₂O-DEPC (Invitrogen). Mantener en hielo.
- 2.- Poner el tejido en el tubo con 800 μ l de *TriPure Isolation Reagent* (Roche Applied Science) en hielo, con 100 mg de perlas de cristal (Glass Beads Acid-washed, SIGMA).
- 3.- Cortar el tejido en trozos más finos dentro del tubo con *TriPure Isolation Reagent*.
- 4.- Homogenizar ([FastPrep-24 (MP Biomedicals) por 60 seg, a una velocidad de 6 m/s] y pistilo para terminar de macerar). Mantener en hielo.
- 5.- Centrifugar a 14,000 rpm por 5 min a 4°C.
- 6.- Transferir la fase superior (aprox. 800 μ l) un nuevo tubo de 1.6 ml. Evitando tocar el fondo (perlas de cristal+tejido).
- 7.- Incubar 5 min a temperatura ambiente.
- 8.- Agregar 300 μ l de cloroformo y vortexear por 10 seg.
- 9.- Incubar 5 min a temperatura ambiente.
- 10.- Centrifugar a 14,000 rpm por 5 min a 4°C.
- 11.- Transferir la fase acuosa a un tubo de 1.6 ml (sin tocar la fase intermedia) aprox. 450 μ l.
- 12.- Agrega 500 μ l de etanol al 100% y mezclar por inversión 5 veces. Incubar 30 min a -20°C.
- 13.- Centrifugar a 14,000 rpm por 15 min a 4°C.
- 14.- Lavar pellet con 500 μ l de etanol al 75% (preparado con DEPC). Incubar en hielo por 10 min.
- 15.- Centrifugar a 14,000 rpm por 5 min a 4°C y descartar el sobrenadante.
- 16.- Repetir los pasos 14 y 15.
- 17.- Descartar el etanol y secar a temperatura ambiente (aprox. 20 min).
- 18.- Resuspender el pellet en ~20-50 μ l de DEPC (reposar 10 min a temp. amb.).
- 19.- Disolver el pellet por pipeteo muy suave.

Anexo III

PROTOCOLO PARA LA PURIFICACIÓN DE ARN MENSAJERO (ARN poly A) CON EL KIT *Poly(A)Purist Kit*

- 1.- Se agrega al ARN un volumen de 2X Binding Solution y se mezcla.
- 2.- Se transfiere al tubo que contiene la celulosa de Oligo(dT) y se mezcla por pipeteo suavemente.
- 3.- Se incuba a 65°C en baño maría por 5 min. y por 30 min (max 60 min) a temperatura ambiente en agitación.
- 4.- Se centrifuga a 4000 rpm por 3 min a temperatura ambiente.
- 5.- Se remueve el sobrenadante con pipeta y se guarda en hielo hasta la verificación de la obtención del ARN poly A.
- 6.- Calentar el buffer *RNA Storage Solution* (75-80°C) en horno de hibridación o baño maría.
- 7.- Se adiciona 500 µl de *Wash Solution 1* al tubo de celulosa Oligo (dT) y se vortexea para mezclar con el tubo cerrado.
- 8.- Se transfiere la solución del tubo de celulosa Oligo (dT) a una columna que deberá ser colocada en un tubo de 2 ml.
- 9.- Se centrifuga a 4000 rpm por 3 min a temperatura ambiente. Se descarta el filtrado y se coloca de nuevo la columna en el tubo de 2 ml.
- 10.- Se repite el paso 7 y el paso 9.
- 11.- Se adicionan 500 µl de *Wash Solution 2* y se vortexea para mezclar con el tubo cerrado.
- 12.- Se repite el paso 9 y el paso 12 dos veces más.
- 13.- Para recuperar el ARN poly A, se colocó la columna en un tubo nuevo de 2 ml, se coloca por 45 seg a 75 °C y se adiciona 200 µl del buffer *RNA Storage Solution* previamente calentado y se vortexea para mezclar con el tubo cerrado.
- 14.- Se centrifuga a 5000 rpm por 2 min y se coloca la columna nuevamente en el tubo.
- 15.- Se adiciona 200 µl del buffer *RNA Storage Solution* previamente calentado y se vortexea para mezclar con el tubo cerrado, se centrifuga a 5000 rpm por 2 min y se descarta la columna.
- 16.- Para precipitar el ARN poly A, se adicionan 40 µl de acetato de amonio 5M, 1 µl de glicogeno y 1.1 ml de etanol al 100 %. Mezclar suavemente y dejar precipitar toda la noche a -20°C.
- 17.- Para recuperar el ARN poly A se centrifuga a 12000 rpm por 30 min a 4 °C y se remueve el sobrenadante cuidadosamente.
- 18.- Se adiciona 1 ml de etanol al 70%, se vortexea levemente y se centrifuga a 12000 rpm por 10 min a 4 °C.
- 19.- Se descarta el sobrenadante y se deja secar el pellet por 5 min a temperatura ambiente.
- 20.- Se resuspende el pellet en 20 µl del Buffer *RNA Storage Solution* y se preserva a -70°C.

Anexo IV

EXTRACCION DE ADN PROTOCOLO PARA ABULON

(Modificado de Sweijd *et al*, 1998)

- 1) Se coloca la muestra en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml, habiéndole quitado previamente el exceso de alcohol con agua destilada.
- 2) Se agregan 700 μ l de la solución de lysis TNES: Tris 100 mM, EDTA 50 mM, NaCl 400 mM, SDS 1%, pH 8
- 3) Se adicionan 1.7 μ l de PK (Concentración de sol. de Proteinasa K: 20 mg/ml). La concentración final, de Proteinasa K en la reacción, debe ser de 50 μ g/ml.
- 4) Se incuban a 37°C toda la noche (aprox. 18 hrs)
- 5) Se agregan 262 μ l de NaCl 2M
- 6) Se agregan 70 μ l de CTAB al 12.5%
- 7) Se incuban por una hora a 65°C
- 8) Se adicionan 700 μ l de Cloroformo-Alcohol Isoamílico (proporción 24:1)
- 9) Agitar suavemente, en el horno de hibridación o manualmente, por 10 min
- 10) Centrifugar a 8000 RPM durante 10 min
- 11) Pasar el sobrenadante a nuevos tubos
- 12) Repetir los pasos del 8 al 11 dos veces mas
- 13) Se agregan 800 μ l de Alcohol Etilico absoluto enfriado a -20°C
- 14) Invertir los tubos y poner a incubar a -20°C por mas de 20 min
- 15) Centrifugar 10 min a 8000 RPM (si se observa precipitado) ó, 14000 RPM (sino se observa precipitado)
- 16) Desechar por decantación el sobrenadante (teniendo mucho cuidado de no perder el botón-ADN)
- 17) Agregar 1 ml de Alcohol etílico al 70%
- 18) Centrifugar 10 min a 8000 RPM (si se observa precipitado) ó, 14000 RPM (sino se observa precipitado)
- 19) Desechar por decantación el sobrenadante (teniendo mucho cuidado de no perder el botón-ADN)
- 20) Poner a secar el botón, destapando los tubos en la campana de extracción por 30 min o hasta que el botón se vuelva transparente. Alternativamente se puede utilizar centrifuga de vacío
- 21) Agregar 100 μ l de "TE" Buffer: Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5
- 22) Agregar 0.5 μ l de Ribonucleasa (RNAsa), de una solución a 10 mg/ml. Para tener una concentración final de 50 μ g/ml (según protocolo de la Ribonucleasa de sigma R 6113).
- 23) Incubar 30 min a 37°C.
- 24) Mantener a 4°C hasta que sea utilizado.

Anexo V

Lisis Alcalina (Minipreps)

- 1.- Transferir 1.5 ml de cultivo bacteriano a un tubo eppendorf.
- 2.- Centrifugar 1 min a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante totalmente.
- 3.- Agregar 100 µl de *Cell resuspension solution* (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM de EDTA pH 8.0; 80 µg de RNAsa) y resuspender el pellet.
- 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).
- 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.
- 6.- Centrifugar por 1 min a máxima velocidad y transferir sobrenadante a un tubo nuevo.
- 7.- Agregar 200 µl de isopropanol y mezclar.
- 8.- Centrifugar por 1 min a máxima velocidad y descartar sobrenadante.
- 9.- Agregar 500 µl de etanol al 70% mezclar.
- 10.- Centrifugar por 1 min a máxima velocidad y descartar sobrenadante, volver a centrifugar y eliminar sobrenadante con punta.
- 11.- Agregar 25 µl de H₂O estéril y resuspender el pellet.
- 12.- Realizar digestión enzimática o la amplificación con los cebadores M13-F y M13-R.

Anexo VI

Solución acuosa de sal sulfato

- 1.- A 935 ml de H₂O estéril se agregan 25 ml de Citrato de Sodio 1.0 M y 40 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0.
- 2.- Se coloca en el agitador magnético de placa caliente a una temperatura moderada.
- 3.- Poco a poco se agregan 700 gr de sulfato de amonio hasta disolverse completamente.
- 4.- En frío se ajusta el pH a 5.2 con H₂SO₄.