



**Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A.C.**

**CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN DE
MIOSTATINA DE PARGO FLAMENCO (*Lutjanus guttatus*)
DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO, LARVARIO
Y JUVENIL**

Q.F.B. Julia María Torres Velarde

TESIS APROBADA POR LA

**UNIDA MAZATLÁN
EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL**

Como requisito parcial para obtener el grado

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Julia María Torres Velare, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Directora de Tesis

Dr. Leonardo Ibarra Castro
Asesor

Dra. Itzel Sifuentes Romero
Asesor

M.C. Luz Estela Rodríguez Ibarra
Asesor

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado, las facilidades y atenciones prestadas.

Al proyecto Crecimiento muscular en vertebrados e invertebrados marinos: expresión y función de la miostatina, a cargo de la Dra. Silvia Alejandra García Gasca, por el apoyo otorgado en la realización del trabajo.

A la Dra. Silvia Alejandra García Gasca por su gran apoyo, paciencia, confianza, enseñanza y todo lo que este trabajo es, gracias a ella, le estaré eternamente agradecida, ¡¡¡MUCHISMAS GRACIAS!!! La quiero y admiro muchísimo, es una excelente persona, en verdad hay muy pocas personas tan lindas e inteligentes como Usted.

A M.C. Rubí Hernández, por su infinita PACIENCIA, enseñanzas, consejos y amenas pláticas, ¡Mil gracias Rubí!

Al Dr. Pablo Almazán, porque desde el primer día que fui a CIAD, me ayudó y orientó para ingresar al posgrado y sobre todo por el apoyo incondicional durante todo el posgrado.

A todos los miembros de mi comité de tesis, Dra. Itzel, Dr. Leonardo, M.C. Estela y Dr. Bruno, no solo por sus excelentes consejos, sino porque siempre me hicieron sentir en confianza.

A todos los integrantes del laboratorio de molecular y bacteriología, Carmen, Itzel, July, Catherine, por sus consejos, apoyo y prestarme siempre todo el material para realizar mi trabajo, ¡muchas gracias!

A los Dres. Miguel Betancourt, Juan Madrid y César Berlanga por su tiempo, gran paciencia, aportaciones y ayuda en los análisis estadísticos.

Al Dr. Miguel Betancourt por su excelente apoyo y gran motivación en seguir adelante.

Al laboratorio de Reproducción-Planta Piloto de peces marinos y al laboratorio de Ecotoxicología por las facilidades que me otorgaron en utilizar sus equipos y materiales.

A los M.C. Estela Rodríguez y Emir Peña por su valiosa ayuda en la recolección de muestras para mi trabajo.

A todos los integrantes de la planta piloto, a los M.C. Estela, Isabel, Gabriela, Ángel, Juan, Noemi; Biólogo Armando, Srs. Omar, Felipe, Juan, Francisco, Luis,

Manuel, por su gran y excelente ayuda durante los muestreos, este trabajo es en gran parte gracias a ustedes.

A todos mis maestros, Dres. Pablo, Ale, Omar, Arturo, Albert, César, Miguel, Juan, Sonia y M.C. Héctor, porque gracias a sus enseñanzas, he logrado alcanzar una gran meta, que es mi Maestría, ¡muchas gracias!

A todos y cada una de las personas que laboran en CIAD, por su gran amabilidad, siempre me hicieron sentir como en casa.

A toda mi familia, en especial a mi abuelita, porque doy gracias por pertenecer a una familia tan hermosa y unida, gracias a ustedes soy la persona que soy y sobre todo a mi mami y hermanito que son las personas que más amo en el mundo.

A mi novio Paúl, porque siempre estuviste ayudándome y apoyándome en todo, sobre todo cuando más lo necesito. ¡Mil gracias!

A mis amigos y compañeros de la maestría, África, Cathy, Carlos, Daniel, Yasmín, Asahel, Mily, Patsy y Rodrigo, por todo su apoyo y convivencias que hicieron muy pero muy divertido estos dos años de estudio.

A mis amigos de toda la vida, porque a pesar que en este tiempo que duro mi maestría, los descuide, me perdí de fiestas, viajes y muchos miércoles de café, sé que están y estarán ahí, los quiero muchísimo mejor "o" ever, ¡son los mejores amigos que hay en el mundo!

A mi princesa Nalita, que adoro, porque siempre me recibe con todo el amor de mundo.

A todos y cada una de las personas que ha dejado una enseñanza en mi vida...
¡MUCHAS GRACIAS!

DEDICATORIA

A mi mami, la persona que más amo en el mundo, todo lo que soy se lo debo a ella, porque no me va alcanzar la vida para agradecerle todo el apoyo y amor que siempre me ha brindado, es maravillo tener una madre que es una excelente persona, que admiras y que cuando piensas en el futuro como quieres ser, solo piensas en que ella es tu mejor ejemplo a seguir, TE AMO MAMI. A mi hermanito, porque es y siempre serás mi mejor amigo, compañero, confidente y porque reúnes todas las características para ser el mejor hermano del mundo. Gracias por siempre estar conmigo y aguantar mi carácter, este y cada uno de mis logros es por ustedes y para ustedes, son mi motor de vida para seguir adelante, no importa que tan difícil sea mi camino, solo deseo que ustedes estén a mi lado...

A la hermosa familia que tengo, porque si me dieran a escoger de nuevo una familia, sin duda escogería la misma familia a la que pertenezco, los quiero muchísimo.

A la Dra. Alejandra porque aun sin conocerme, me brindo su confianza y cariño, dándome la oportunidad de ser parte de su equipo.

CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tablas.....	xv
Resumen.....	xvii
Abstract.....	xviii
Capítulo 1. Introducción.....	1
Capítulo 2. Antecedentes.....	8
Justificación.....	13
Hipótesis.....	14
Objetivo General.....	14
Objetivos Específicos.....	14
Capítulo 3. Materiales y Métodos.....	15
3.1 Objetivo 1. Aislar, secuenciar y caracterizar la región codificante del gen de miostatina en pargo flamenco (<i>Lutjanus guttatus</i>).....	15
3.1.1 Extracción de ARN y síntesis cDNA.....	15
3.1.2 Diseño de oligos (primers).....	15
3.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final.....	16
3.1.4 Aislamiento transcrito del gen de miostatina.....	18

CONTENIDO (continuación)

	Página
3.1.5 Identificación y caracterización del transcrito del gen de miostatina.....	16
3.2 Objetivo 2. Cuantificar el nivel de expresión de la miostatina durante el desarrollo embrionario, larvario y juvenil.....	19
3.2.1 Muestreo de organismos.....	19
3.2.2 Diseño de oligos (primers) para el análisis de expresión génica por PCR en tiempo real (qPCR) y análisis de genes de referencia.....	20
3.2.3 Extracción de ARN para análisis por qPCR.....	22
3.2.4 PCR punto final.....	22
3.2.5 Cuantificación de la expresión génica por qPCR.....	22
3.2.6 Análisis estadísticos.....	24
3.3 Objetivo 3. Evaluar el patrón de expresión en el músculo y relacionarlo con el crecimiento en peso del pez.....	24
3.4 Objetivo 4. Cuantificar la expresión de la miostatina en diferentes tejidos.....	25
3.4.1 Muestreo de organismos.....	25
3.4.2 Extracción de ARN.....	25

CONTENIDO (continuación)	Página
3.4.3 Diseño de oligos (primers) para el análisis de expresión génica por PCR en tiempo real y análisis de genes de referencia.....	26
3.4.4 PCR punto final.....	26
3.4.5 Cuantificación de la expresión génica por qPCR.....	26
3.4.6 Análisis estadísticos.....	26
3.4.7 Aislamiento transcrito del gen de miostatina en órganos.....	26
Capítulo 4. Resultados y Discusión.....	28
4.1 Objetivo 1. Aislar, secuenciar y caracterizarla región codificante del gen de miostatina en9 pargo flamenco (<i>Lutjanus guttatus</i>).....	28
4.2 Objetivo 2. Cuantificar el nivel de expresión de la miostatina durante el desarrollo embrionario, larvario y juvenil.....	35
4.3 Objetivo 3. Evaluar el patrón de expresión en el músculo y relacionarlo con el crecimiento en peso del pez.....	44
4.4 Objetivo 4. Cuantificar la expresión de la miostatina en diferentes tejidos.....	52
Capítulo 5. Conclusiones.....	58
Capítulo 6. Recomendaciones.....	59
Literatura citada.....	60

CONTENIDO (continuación)

	Página
Anexos 1.....	69
Anexos 2.....	80
Anexos 3 Expression of myostatin in the spotted rose snapper (<i>Lutjanus guttatus</i>) during larval and juvenile development under cultured conditions.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Modelo para la función de la miostatina en el crecimiento muscular. Figura tomada de Thomas <i>et al.</i> , 2000.....	5
2	Procesamiento proteolítico de la proteína de miostatina. Figura tomada de Rodgers & Garikipati, 2008.....	7
3	Alineaciones múltiples (Multialin) del gen de miostatina.....	16
4	PCR Fish-Mstn F1 y R1 fragmento 5'.....	28
5	Digestión del plásmido Fish-Mstn-F1 y R1. La flecha indica la clona que posee el fragmento del gen de miostatina.....	28
6	PCR Fish-Mstn-F2 y R2 fragmento 3'.....	29
7	Digestión del plásmido Fish-Mstn F2 y R2. Todas las clonas poseen el fragmento de miostatina.....	29
8	Región codificante de miostatina para <i>L. guttatus</i> de 1134 pb y su traducción de 377 aminoácidos.....	30
9	Sitios conservados del gen de miostatina perteneciente a la familia de Factores de Crecimiento Transformante beta (TGF- β).....	32
10	Alineación <i>L. russellii</i> (DNA genómica) y <i>L. guttatus</i> región codificante.....	33

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
11	<p>Árbol filogenético de secuencias ortólogas de miostatina. La parte superior agrupa la miostatina 1, la cual es muy conservada entre las diferentes especies de peces y la parte inferior muestra la miostatina 2, la cual presenta secuencias menos conservadas entre especies. Las secuencias de miostatina humana y pollo se utilizaron como grupos externos. La flecha indica la miostatina de <i>L. guttatus</i> que agrupa con la miostatina 1.....</p>	34
12	<p>Curva estándar 18S ribosomal.....</p>	35
13	<p>Curva estándar beta actina.....</p>	36
14	<p>Curva estándar miostatina.....</p>	36
15	<p>Método Delta CT para estabilidad de genes de referencia. El eje Y indica la estabilidad, hacia la izquierda corresponde genes más estables y hacia la derecha menos estables.....</p>	37
16	<p>Método NormFinder para estabilidad de genes de referencia. El eje Y indica la estabilidad, hacia la izquierda corresponde genes más estables y hacia la derecha menos estables.....</p>	37
17	<p>Método Genorm para estabilidad de genes de referencia. El eje Y indica la estabilidad, hacia la izquierda corresponde genes más estables y hacia la derecha menos estables.....</p>	37

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
18	Método Comprehensive Ranking para estabilidad de genes de referencia. El eje Y indica la estabilidad, hacia la izquierda corresponde genes más estables y hacia la derecha menos estables.....	37
19	Método BesKeeper para estabilidad de genes de referencia. El eje Y indica la estabilidad, hacia la izquierda corresponde genes más estables y hacia la derecha menos estables.....	38
20	Expresión miostatina durante la etapa embrionaria y larvaria (10hrs a 42dpe). Las fechas indican diferencias significativas con respecto al nivel basal (14hpf-0dpe). Los extremos de cada caja representan del 25% al 75% de los datos, la línea en el centro de la caja representa la mediana, las líneas que se extienden de las cajas simbolizan los valores máximos y los puntos valores atípicos.....	39
21	Expresión miostatina durante la etapa juvenil (49 a 91 dpe). La flecha indica diferencia significativa en los niveles de expresión con respecto a los demás días. Los extremos de cada caja representan del 25% al 75% de los datos, la línea en el centro de la caja representa la mediana, las líneas que se extienden de las cajas simbolizan los valores máximos y los puntos valores atípicos.....	42

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
22	Expresión miostatina durante la etapa embrionaria, larvaria y juvenil. Las fechas indican diferencias significativas en los niveles de expresión con respecto al nivel basal (14hpf y 0dpe). Los extremos de cada caja representan del 25% al 75% de los datos, la línea en el centro de la caja representa la mediana, las líneas que se extienden de las cajas simbolizan los valores máximos y los puntos valores atípicos.....	44
23	Crecimiento en peso durante el desarrollo juvenil.....	45
24	Correlación peso-talla en juveniles (49 a 91 dpe).....	46
25	Correlación entre la expresión de miostatina y el peso durante la etapa juvenil (49-91dpe).....	48
26	Expresión miostatina en 2 grupos de peso con relación a la media (6.6g). Los extremos de cada caja representan del 25% al 75% de los datos, la línea en el centro de la caja representa la mediana, las líneas que se extienden de las cajas simbolizan los valores máximos y los puntos valores atípicos.....	49
27	Expresión miostatina en 6 grupos de peso referentes a las media. 1, 2 y 3 menores a la media y 4, 5, y 6 mayores a la media en peso. La flecha indica diferencia significativa en los niveles de expresión con respecto a los demás días. Los extremos de cada caja representan del 25% al 75% de los datos, la línea en el centro de la....	59

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
27	caja representa la mediana, las líneas que se extienden de las cajas simbolizan los valores máximos y los puntos valores atípicos.....	50
28	Expresión miostatina en órganos de <i>L. guttatus</i> a los 194dpe. 1=corazón, 2=Ojo, 3=cerebro, 4=Estómago, 5=riñón, 6= vejiga natatoria, 7=branquia, 8=hígado, 9=intestino y 10=músculo. Las fechas indican diferencias significativas en los niveles de expresión. Los extremos de cada caja representan del 25% al 75% de los datos, la línea en el centro de la caja representa la mediana.....	54
29	Alineación de miostatina aislada de músculo (<i>L. guttatus-mstn-1mus</i>), miostatinas aisladas de cerebro (<i>L. guttatus-mstn1a-ce</i> y <i>L. guttatus-mstn1b-ce</i>) y <i>L. russellii</i> . En el recuadro de línea continua muestra la delección de 75nt en el transcrito de miostatina-1b de cerebro. El recuadro con línea discontinua muestra las zonas donde se localizan los oligos utilizados en el análisis por qPCR.....	55
30	Región codificante de miostatina para <i>L. guttatus</i> miostatina-1b de 1059 pb y su traducción de 352 aminoácidos. En gris se indica la región de procesamiento proteolítico y las 9 cisteínas conservadas en el péptido activo.....	56

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Características de los oligos utilizados inicialmente para amplificar el transcrito de miostatina.....	15
2	Reactivos y cantidades para PCR.....	17
3	Oligos específicos para qPCR.....	21
4	Mezcla maestra para qPCR.....	23
5	Curva estándar 18S ribosomal, β actina y miostatina.....	35
6	Media y desviación estándar de peso y talla desarrollo juvenil.....	45
7	ANOVA 1 vía en grupos de peso 1 y 2 con respecto a la media.....	49
8	ANOVA 1 vía en 6 grupos de peso.....	50
9	ANOVA 2 vías en grupos de peso y edad.....	51
10	Comparaciones pareadas con el método Fisher (LSD) para grupos de peso.....	51
11	Análisis de estabilidad de genes de referencia para tejidos de <i>L. guttatus</i> de 194dpe.....	52
12	ANOVA 1 vía entre órganos de 194dpe.....	53

RESUMEN

El crecimiento muscular se encuentra regulado por diversos factores, entre estos factores se encuentra la miostatina, miembro de la familia de TGF- β , considerado como inhibidor de la proliferación y diferenciación celular de miocitos. Desde su descubrimiento y debido al papel importante que desempeña, se ha buscado potencializar su aplicación en especies de interés comercial. Debido a que el pargo flamenco *Lutjanus guttatus* presenta una importante demanda comercial, en el presente trabajo se proporcionó el patrón de expresión del gen de miostatina en embriones, larvas y juveniles en condiciones de cultivo, para, en un futuro próximo, implementar métodos de bloqueo post-transcripcional por RNA de interferencia (RNAi) con el objetivo de acelerar el crecimiento y mejorar la producción. La secuencia codificante de la miostatina de *L. guttatus* fue aislada de tejido muscular y secuenciada, obteniendo 1134 pb, los cuales codifican un péptido de 377 amino ácidos. Posteriormente se midieron los niveles de expresión en estadios embrionarios, larvarios y juveniles mediante qPCR. Se encontró que la expresión inicia desde el desarrollo embrionario pero se mantiene en niveles bajos hasta el día 28 post-eclosión (dpe), donde aumentó significativamente, coincidiendo con el periodo de metamorfosis de la larva. Posteriormente la expresión se mantuvo fluctuante, coincidiendo probablemente con momentos de rápido y lento crecimiento muscular. La expresión de miostatina fue también analizada por peso, donde, independientemente de la edad, incrementó en organismos con menor tasa de crecimiento. La miostatina se encuentra ampliamente expresada en otros tejidos de *L. guttatus*, presentando mayores niveles en cerebro, ojo y branquia, indicando que la miostatina en peces participa en otros procesos fisiológicos además del crecimiento muscular.

Palabras clave: miostatina, *Lutjanus guttatus*, crecimiento muscular, expresión génica.

ABSTRACT

Muscle growth is regulated by several factors, among these factors, myostatin, a member of the TGF- β family, is considered a negative regulator of myocyte proliferation and differentiation. Since its discovery and due to the important role it performs, it became a target for biotechnological application in commercial species. Since the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* is commercially important, in this study, we present the expression pattern of myostatin in embryos, larvae and juveniles under culture conditions, and, in the near future, we expect to perform post-transcriptional gene silencing by RNAi to accelerate muscle growth and improve production. The full coding sequence of myostatin from *L. guttatus* was isolated from muscle tissue and sequenced, obtaining 1134 bp, which encode a peptide of 377 amino acids. Expression levels were measured in embryonic, larval, and juvenile stages by qPCR. Myostatin expression was detected in the embryo, and maintained at low levels until 28 days post-hatch (dpe), when it showed a significant increase, coinciding with metamorphosis. After that, expression was fluctuating, coinciding probably with periods of rapid and slow muscle growth. Myostatin expression was also analyzed by weight and, regardless the age, higher levels were detected in smaller animals. Myostatin is also expressed in other tissues from *L. guttatus*, presenting higher expression levels in brain, eye, and gill, indicating that in fish, myostatin participates in physiological processes other than muscle growth.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de las células de los organismos vivos tienen la propiedad de ser contráctiles, sin embargo, es en las células musculares donde las funciones básicas se han desarrollado con base a esta propiedad, permitiendo a los organismos vivos moverse, gracias a que en el tejido muscular la energía química es transformada en energía mecánica; además el tejido muscular es el tejido más abundante, ya que constituye alrededor del 40-50% del peso corporal (Welsch & Sobotta, 2009) y está compuesto principalmente de filamentos de actina y miosina, así como de otras proteínas. Sin embargo encontramos tres tipos de tejido muscular, los cuales difieren de acuerdo a su apariencia y localización.

El **tejido muscular liso** conforma la pared de muchas vísceras huecas tales como tubo digestivo, vías urinarias, conductos genitales, vasos sanguíneos y vías respiratorias. Es controlado por el sistema nervioso vegetativo (autónomo/involuntario) pero puede reaccionar ante influencias externas, realiza movimientos relativamente lentos pero no se fatiga con rapidez, ya que puede desarrollar gran fuerza durante lapsos prolongados. El **tejido cardíaco** es un tejido estriado involuntario altamente especializado, localizado solamente en el corazón; las células se encuentran estriadas transversalmente de manera multinuclear, al igual que en el músculo liso los núcleos se encuentran en el centro. El **músculo estriado o esquelético** constituye el aparato locomotor de los organismos, pero también está presente en órganos como lengua, diafragma, esófago, etc.; responde a estímulos voluntarios siendo capaz de alcanzar gran fuerza en un lapso de tiempo breve, pero también se fatiga rápidamente; posee células alargadas y multinucleadas llamadas fibras musculares (Welsch & Sobotta, 2006).

Las células musculares no se dividen durante la vida de un organismo, sólo se forman durante el periodo de gestación (miogénesis), debido a que son altamente diferenciadas. Durante el desarrollo embrionario, en mamíferos los mioblastos se originan a partir de células del mesodermo llamadas somitas,

localizadas a los lados del tubo neural del embrión. A medida que hay proliferación de células mesodérmicas, se efectúan mecanismos de migración a distintos destinos. Una vez concretado este periodo, las células dejan de dividirse, se fusionan formando sincitios, llamados miotubos, hasta alcanzar su diferenciación en músculo maduro (Lodish *et al.*, 2006)

Los procesos de determinación, proliferación, migración y diferenciación de células musculares son regulados por la activación de genes que codifican factores de diferenciación celular miogénicos. Estos genes pertenecen a la familia de factores de transcripción llamada familia MyoD, factores de regulación muscular (MRFs) con estructura hélice-hélice y los factores mejoradores de miocitos 2 (MEF2), expresándose en forma secuencial. Primeramente, Pax-3 y Myf-5 iniciarán la expresión de MyoD, comprometiendo a células indiferenciadas a abandonar el ciclo celular y diferenciarse. Posteriormente se fusionan y expresan miogenina y MRF-4, para que los miotubos se diferencien hacia células maduras del tejido muscular, llamadas fibras musculares (Cediel *et al.*, 2009; Perry & Rudnick, 2000; Yun & Wold, 1996). Se ha demostrado también que las histonas acetilasas y desacetilasas son esenciales para la regulación de genes específicos del músculo (Kouzarides, 1999).

Muchos son los factores que inducen atrofia o hipertrofia en el tejido muscular; como el factor de crecimiento insulina (IGF), calcineurina, desmina, myf5, mrf4, MyoD y miogenina, que actúan como reguladores positivos del crecimiento muscular, mientras que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina I, componentes de la vía de ubiquitinas (ligasas MURF-1 y Atrogina-I), familia de factores de crecimiento transformante beta (TGF- β) y factores fisiológicos como la edad y enfermedades, son identificados como reguladores negativos del crecimiento muscular (Stewart & Rittwegger, 2006).

Un importante miembro de la familia de TGF- β , es el factor de diferenciación de crecimiento 8 (GDF-8) conocido como miostatina, considerado como inhibidor de proliferación y diferenciación celular de miocitos. Es también un importante regulador de adipogénesis (Rebbapragada *et al.*, 2003) lo que indica su

participación en distintos procesos. La miostatina fue inicialmente identificada en una mutación natural en ganado vacuno europeo, conocido como “doble musculatura”, en la cual, los organismos que poseen la mutación presentan un fenotipo con el doble de crecimiento en su musculatura (Grobet *et al.*, 1997), esta mejora en el crecimiento muscular en los animales, es debido al incremento tanto en el número de células (hiperplasia), como en el tamaño de las células (hipertrofia) dando como resultado miofibras más grandes y pesadas (Rodgers & Garikipati, 2008). Sin embargo, la función de miostatina fue esclarecida mediante estudios de mutagénesis dirigida, en donde McPherron y colaboradores (1997) determinaron que la delección en esta proteína daba como consecuencia un significativo crecimiento en la musculatura de ratones (-/-) en comparación con los ratones silvestres, planteando que la miostatina actúa como un regulador negativo del crecimiento, reduciendo el número de fibras y su función y estructura que ha sido altamente conservada entre especies.

De acuerdo con el papel que desempeña la miostatina como inhibidor del crecimiento muscular se han realizado estudios confirmando este supuesto; por ejemplo, se observó que las concentraciones de miostatina en suero e intramusculares, incrementan en pacientes hombres infectados con el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH), que presentan pérdida de peso, comparados con individuos sanos, por lo que autores proponen la hipótesis que la miostatina impide el crecimiento del músculo esquelético en hombres adultos y contribuye a la pérdida de masa muscular en pacientes infectados con VIH (Argilés *et al.*, 2012; González-Cadavid *et al.*, 1998), de esta forma inhibidores de la miostatina ayudaría a mejoras en los síntomas de este padecimiento. Se ha reportado también, que los transcritos y la proteína de la miostatina se encuentra en niveles elevados en ratas de edad avanzada, sugiriendo que la miostatina está involucrada en la atrofia muscular ocasionada por la edad avanzada. Hombres y mujeres de mediana edad poseen concentraciones mayores de miostatina que individuos más jóvenes. Por consecuencia, la disminución en los niveles de miostatina en adultos mayores mejoraría su calidad de vida con respecto a la pérdida de masa corporal y debilidad (Argilés *et al.*, 2012).

Con fines de determinar la función que la miostatina desempeña, y en que periodos del desarrollo inicia su función, se encontró que en ratón, la miostatina se expresa durante la embriogénesis de las células del miotomo de los somitas y continúa en ratones adultos, demostrando que la miostatina participa en la regulación homeostática posnatal suprimiendo el crecimiento muscular (Lee, 2010). Al parecer, el principal factor que deprime tanto el número de mioblastos que alcanzan divisiones de diferenciación terminal y el grado de alargamiento de las fibras, es la miostatina (Bass *et al.*, 1999)

La miostatina controla la proliferación celular inhibiendo la progresión de mioblastos en fase G1 a fase S durante el ciclo celular, específicamente regulando p21 que inhibe Cdk2 (cinasa dependiente de ciclina 2) en células satélite, por lo tanto, las células se mantienen en senescencia (McCroskery *et al.*, 2003) (Figura 2). Se ha demostrado que la miostatina inhabilita la actividad de Cdk4 promoviendo la degradación de la ciclina D1, así la célula no continúa con la replicación de DNA. De esta manera, la proteína retinoblastoma (Rb) se encuentra en su forma activa (hipofosforilada) por la ausencia de Cdk4/Cdk2 (la cual hiperfosforila a Rb para su inactivación), así Rb se une a E2F (factor de transcripción que induce progresión celular) y no procede la síntesis de ADN (fase S) deteniendo el ciclo celular en presencia de miostatina (Thomas *et al.*, 2000 & Wei *et al.*, 2006) (Fig. 1). A pesar que la miostatina induce a las células a un estado de senescencia, esta puede ser reversible, reiniciando la proliferación celular, promoviendo la expresión de factores de diferenciación celular miogénicos, como Pax-3 y MyoD (Amthor *et al.*, 2006). Estos estudios sugieren que la miostatina es un factor de supervivencia en los mioblastos, ya que estimula el arresto del ciclo celular. Por lo tanto, la miostatina inicia el primer paso necesario en el proceso de diferenciación, arresto del ciclo celular y previene la apoptosis de células en senescencia (Rodgers & Garikipati, 2008).

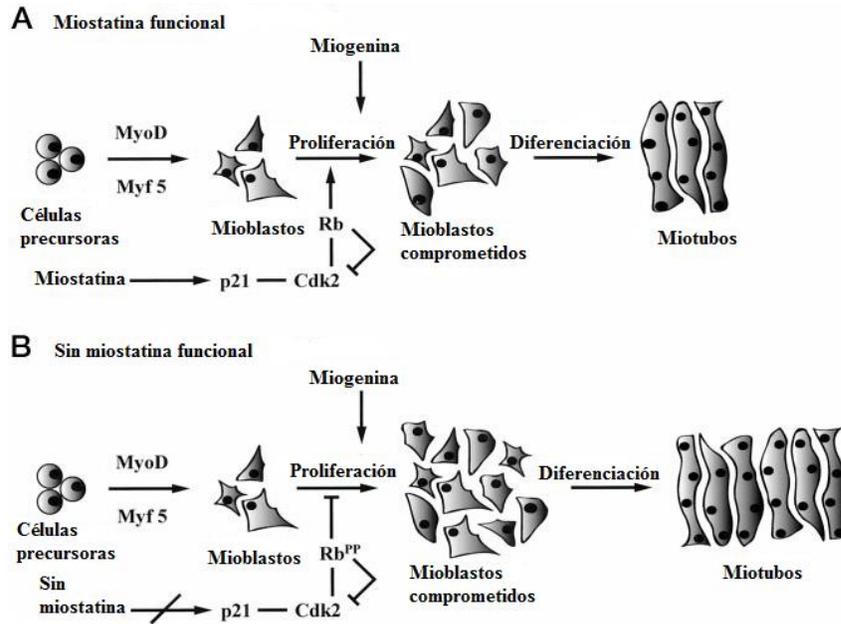


Figura 1. Modelo para la función de la miostatina en el crecimiento muscular. Figura tomada de Thomas *et al.*, 2000.

Ming *et al.* (2008), probaron que la miostatina bloquea el reclutamiento de p300 al promotor de la ciclina D1 resultando en el silenciamiento de la expresión de ciclina D1, así la miostatina disminuye los niveles de proteína p300 induciéndola a su degradación a través del sistema ubiquitina-proteosoma, mostraron la primera evidencia de regulación epigenética en la expresión génica mediada por miostatina a través de la degradación de p300 por la ruta de señalización Fosfatidinosil 3-kinasa (PI3K) /PTEN/Akt).

En conclusión, todos los estudios en conjunto, sugieren que la miostatina, fundamentalmente, limita el tamaño del músculo esquelético, inhibiendo el crecimiento hiperplásico de los mioblastos y por lo tanto el número de células que eventualmente se diferencian en miofibras maduras y finalmente reduciendo la síntesis de proteínas de miofibras y la regeneración de células satélite, ambos inhibiendo hiperplasia en el músculo maduro (Rodgers &Garikipati, 2008).

La secuencia de ADNc de miostatina en humanos codifica una proteína precursora de 376 aminoácidos, con todas las características encontradas en otros miembros de la familia TGF- β , los cuales incluyen: a) un extremo amino terminal, importante para el correcto plegamiento de la proteína precursora y en la

capacidad de la proteína madura de formar homodímeros (Jin *et.al.*, 2004) b) una pro-región seguida de una secuencia RSRR que representa un sitio de procesamiento catalítico y c) un extremo carboxilo terminal con 109 aminoácidos que contienen 9 residuos de cisteína y es donde radica la actividad biológica de la proteína, siendo capaz de formar homodímeros formados por enlaces disulfuro (Lee, 2010).

La activación de Miostatina requiere una serie de escisiones proteolíticas en la proteína precursora. Primeramente, enzimas pertenecientes a la familia de las furinas remueven el péptido señal de 24 aminoácidos. Un segundo corte es efectuado entre los aminoácidos 240-243 dando por resultado dos fragmentos: un pro-péptido amino terminal de 27.640 KDa y un dominio carboxilo terminal de 12.4 kDa. Fragmentos paralelos del extremo carboxilo terminal de miostatina se unen a través de enlaces disulfuro, formando dímeros que permanecen unidos al propéptido amino terminal. Este complejo no covalente circula en la sangre y mantiene al dímero de miostatina latente y/o inactivo, es decir, este corte separa el dominio bioactivo del extremo N-terminal, conocido como LAP, por sus siglas en inglés (Latency-associated peptide). La presencia del pro-péptido (pro-Mstn) es importante en la regulación de la actividad de miostatina, representando la forma de mayor abundancia en circulación sanguínea (Lee, 2010) (Fig. 2).

Una tercera escisión en el aminoácido 76 se requiere para activar el extremo carboxilo de miostatina, siendo realizado por un grupo de enzimas diferentes, una metaloproteinasa que pertenece a la familia de las proteínas morfogénicas óseas (BMP) -1/tolloid (TLD) (Lee, 2010, Rodino-Klapac *et al.*, 2009) (Fig. 2).

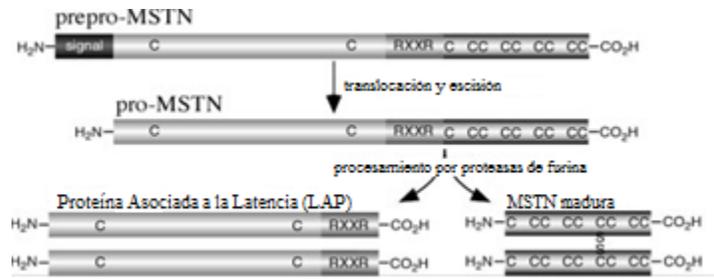


Figura 2. Procesamiento proteolítico de la proteína de miostatina. Figura tomada de Rodgers & Garikipati, 2008.

Una vez activa, la miostatina actúa a través de receptores de activina tipo II y IIB (ActRIIB) en músculo esquelético, aunque ligeramente tenga mayor afinidad por los receptores tipo IB (Lee & McPherron, 2001). Ya formado el complejo, se presume el reclutamiento y fosforilación de receptores de cinasas similares a activina 4 y/o 5. Este proceso conduce a la fosforilación de Smad2 y Smad3 que forman un complejo con Smad4. El complejo Smad 2/3/4 es transportado al núcleo para regular la expresión de genes específicos como factores de regulación miogénica (Rodino-Klapac *et al.*, 2009).

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

El gen de miostatina ha sido aislado en diferentes especies de vertebrados, como perro (Mosher *et al.*, 2007), oveja (Clop *et al.*, 2006) ratón (McPherron *et al.*, 1997) e incluso humanos (Schuelke *et al.*, 2004). Donde la mutación en el gen, traen como consecuencia un incremento en la masa muscular, confirmando el supuesto de la importancia de la miostatina, como regulador negativo del crecimiento muscular en mamíferos e indicando patrones de expresión del desarrollo similares (Roberts *et al.*, 2001).

En mamíferos y aves, el incremento en el número de fibras (hiperplasia) se detiene poco después del desarrollo embrionario y el crecimiento en el músculo es causado principalmente por el crecimiento de las fibras musculares ya existentes (hipertrofia). Por el contrario en la mayoría de los peces, el incremento en el número de fibras continúa a lo largo de su desarrollo, siendo una importante contribución en el crecimiento normal del músculo durante la vida adulta (Rescan, 2005; Rescan *et al.*, 2001; Koumans & Akster, 1995). En peces, el músculo esquelético se deriva de los somitas que se forman durante la segmentación rostro-caudal del mesodermo (Rescan, 2005). Así durante el desarrollo embrionario en peces, las células se comprometen rápidamente al destino miogénico, con la expresión de factores de transcripción miogénicos MyoD, al final de la gastrulación, en contraste con lo embriones amniotas, que no ocurre hasta la somitogénesis, proporcionando una ventaja a los embriones de peces, dándoles la posibilidad de moverse rápidamente después de la eclosión (Currie & Ingham, 2001).

El crecimiento por hipertrofia, en peces, persiste a lo largo de la vida de los juveniles incluyendo el estado adulto, a pesar que el crecimiento por hiperplasia ha cesado. Por otra parte, se han descrito dos sucesivas y distintas fases de la hiperplasia en peces; la primera fase a continuación de la miogénesis embrionaria, completándose la formación de capas musculares definitivas llamada

“estratificada”; posteriormente otro proceso de hiperplasia, resulta en un gran aumento en el número total de fibras en todas las capas musculares, adquiriendo el aspecto típico de “mosaico”, el tiempo en que ocurren estos crecimientos hiperplásicos en relación con el ciclo de vida, varía entre especies, ya que en algunas el primer crecimiento hiperplásico se dan al completar el periodo larvario y la segunda fase inicia después que la metamorfosis ha terminado, o bien ocurre incluso, antes de la metamorfosis (Rescan, 2005; Rowlerson & Veggetti, 2001).

El músculo esquelético en peces, constituye el mayor porcentaje del peso total del cuerpo, que el presente en mamíferos, por lo tanto, cambios mínimos en el crecimiento de los peces podrían mejorar considerablemente desarrollo (Rodgers & Garikipati, 2008). A pesar, que el bloqueo de la miostatina, parece ser una herramienta muy útil en la producción acuícola, aún quedan muchas barreras para que su utilización pueda ser óptima, ya que aún existen algunas incógnitas en la fisiología del pez, que podría limitar el uso de esta tecnología.

Debido al papel importante que desempeña la miostatina, se ha buscado potencializar su aplicación en especies de interés comercial, en los que destaca la industria acuícola. Por lo que se ha secuenciado el gen de la miostatina de diversas especies de peces de alto valor comercial (Funkenstein *et al.*, 2009).

El gen de la miostatina en peces posee tres exones los cuales son altamente conservados, incluso con otros mamíferos y aves (Ye *et al.*, 2007). Muchos han sido los estudios en los cuales, se ha reportado el aislamiento del gen de miostatina en peces de importancia comercial, de hecho, el año 2001 fue declarado como año del pez (“Year of the Fish”) porque fueron descritos más de 16 homólogos del gen de miostatina provenientes de 12 especies diferentes y algunas de estas especies presentaron dos formas de miostatina (Sawatari *et al.*, 2010; Rodgers & Garikipati, 2008; Ostbye *et al.*, 2001; Maccatrozzo *et al.*; 2001; Rescan *et al.*, 2001).

Uno de los primeros reportes del aislamiento del gen de miostatina en especies no mamíferos fue en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*)

identificándose dos isoformas de miostatina, al mismo tiempo mostraron que su expresión no se limita en músculo esquelético, los autores indican que el papel de la miostatina en peces podría tener funciones adicionales, similares a la del factor de diferenciación de crecimiento-11 (GDF-11) en mamíferos (Ostbye *et al.*, 2001).

Xu *et al.* en 2003, reportaron el aislamiento y caracterización del gen de miostatina en pez cebra, los autores analizaron la expresión de ésta en músculo esquelético de embriones, larvas, y adultos; encontrando una débil expresión del gen de miostatina en estadios embrionarios, mientras que fue alta en tejido muscular de larvas nadadoras, juveniles y adultos. Igualmente evaluaron la función biológica de miostatina, demostrando que juega un papel inhibitor en el crecimiento muscular.

Por lo tanto, se ha demostrado la existencia de diferencias en la expresión de miostatina entre peces y otros vertebrados, (Roberts *et al.*, 2001). En mamíferos, hasta la fecha, solo se ha reportado la existencia de una isoforma de miostatina, contrario a lo encontrado en peces, donde se han aislado dos isoformas, o hasta cuatro en el caso de los salmónidos (Garikipati *et al.*, 2007; Garikipati *et al.*, 2006). Estos estudios demuestran que en peces, en contraste con mamíferos y pollos, existen dos distintas isoformas de miostatina con patrones de expresión diferentes (Rodgers *et al.*, 2007; Rescan *et al.*, 2001). Estas isoforma, se cree que provienen de diferentes loci, es decir, surgieron de un caracterizado evento de duplicación del genoma en el linaje de los peces (Rodgers & Garikipati, 2008)

La segunda diferencia entre peces y otras especies de vertebrados, radica en los tejidos donde existe expresión de miostatina, ya que no sólo se limita a músculo. Inicialmente la proteína fue detectada (además de músculo) en cardiomiocitos, fibras de Purkinje del corazón de ratón y ganado (Sharma *et al.*, 1999) y ARNm en glándula mamaria, de cerdos (Ji *et al.*, 1998). En peces, el transcrito tiene mayor distribución en tejidos, como cerebro, ovario, ojo, intestino, branquia (Helterline *et al.*, 2007; Garikipati *et al.*, 2007; Garikipati *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2001; Rodgers *et al.*, 2001; Rescan *et al.*, 2001). Por lo que, se ha

sugerido que la función del gen de la miostatina en peces, no es únicamente en relación al crecimiento muscular, si no también participa en otros procesos fisiológicos (Funkenstein *et al.*, 2009).

Es poco lo que se sabe de la función de la miostatina en otros tejidos; Roberts *et al.*, (2001) mediante análisis de Northern blot en *Salvelinus fontinalis*, reportan que la expresión de miostatina-2 (aislada de ovario y ya conocida como mstn-2) en tejido ovárico en distintos estadios de reproducción es diferente, ya que los niveles del transcrito incrementan durante la ovulación, probablemente por el papel inhibitorio que la folistatina desempeña en la regulación de la miostatina (Lee & McPherron 2001), ya que se ha observado *in vitro* que la folistatina evita la unión de la miostatina a su receptor (Rodgers & Garikipati, 2008), mientras que *in vivo*, ratones knockout de folistatina son más pequeños que los que no tienen la mutación, lo que es consistente con un incremento en la actividad de la miostatina y por consecuencia inhibición del crecimiento muscular (Matzuk *et al.*, 1995).

Actualmente, la función de la miostatina en el cerebro es desconocida, a pesar que se sabe que es expresada en distintas zonas del cerebro. Sin embargo, ha sido relacionada con el Factor de Diferenciación 11 (GDF-11) ya que poseen un dominio bioactivo muy similar (95%) y probablemente desempeña una función en la neurogénesis. Así, el GDF-11 funciona como un regulador negativo del tejido neural, función similar a la que realiza la miostatina en el tejido muscular, por lo tanto, la miostatina podría ejercer funciones similares en distintas partes del cerebro, y existirían cambios compensatorios en la expresión de GDF-11, no permitiendo el desarrollo de fenotipos neuronales en animales sin miostatina (Rodgers & Garikipati, 2008).

Helterline *et al.*, (2007) presentaron un análisis comparativo de la expresión de la miostatina en distintos órganos de diversos peces, donde los patrones de expresión entre las especies no son los mismos, atribuyéndolo a las dificultades en detectar bajos niveles de expresión en algunos tejidos y sobre todo a que la miostatina no se limita al crecimiento y desarrollo del músculo esquelético en peces y, probablemente, influya en otros procesos.

Es importante conocer la expresión extra-muscular de la miostatina y evaluar las posibles afectaciones que su bloqueo pudiera producir en el desarrollo somático del pez, considerando el potencial que estos estudios aportarán al campo de la acuicultura (Ye *et al.*, 2007).

Así el presente trabajo pretende asilar, caracterizar y medir la expresión del gen de miostatina en *Lutjanus guttatus* durante su desarrollo embrionario, larvario, juvenil y en distintos tejidos, para posteriores aplicaciones enfocadas en incrementar la tasa de crecimiento del pargo flamenco.

JUSTIFICACIÓN

L. guttatus es una especie ampliamente estudiada en CIAD Unidad Mazatlán, desde la obtención de huevos y larvas, hasta la producción de juveniles. Se ha reportado que el crecimiento de los juveniles es generalmente más lento (0.22mm por día) las primeras 4 semanas (28dpe) y posteriormente incrementa a 1.34mm por día, a los 60dpe (Álvarez-Lajonchère *et al.*, 2012). Se sabe que las condiciones ambientales juegan un papel primordial para el éxito del cultivo, por lo que es importante la búsqueda de alternativas que lleven a la obtención de más y mejores resultados. Las nuevas investigaciones, en la interacción entre el genoma y factores ambientales proporcionarían nuevas herramientas en la mejora del crecimiento muscular, por lo que, el cultivo de *L. guttatus*, actualmente, ha logrado grandes avances, pero aún requiere de mayor investigación.

Tanto el conocimiento del ciclo reproductivo de la especie, condiciones óptimas para su cultivo y la exploración de nuevos campos, como las herramientas biotecnológicas, permitirán reducir el tiempo que le toma a la especie alcanzar la talla y peso adecuados para iniciar la etapa de engorda en jaulas.

Entonces, considerando las funciones e importancia de la miostatina como regulador negativo de la proliferación celular de tejido muscular, es necesario conocer el patrón de expresión existente durante el desarrollo del pargo flamenco y relacionarlo con el crecimiento del pez.

De esta manera, el presente estudio proporcionará información necesaria para conocer el patrón de expresión normal del gen de la miostatina del pargo flamenco en condiciones de cultivo. Con estos resultados será posible en un futuro cercano aplicar diversos métodos de bloqueo post-transcripcional y/o post-traduccionales, con el objetivo de incrementar la masa muscular y mejorar la producción de pargo flamenco en cultivo.

HIPÓTESIS

Si, al igual que en mamíferos, la miostatina es un inhibidor de la proliferación celular del músculo en peces marinos, entonces se esperaría que sus niveles de expresión en *Lutjanus guttatus*, incrementen en tejido muscular conforme el desarrollo avanza y reduzca la tasa de crecimiento. Si la miostatina lleva a cabo funciones adicionales, se esperaría encontrar también su transcrito en tejidos no musculares.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la región codificante y el patrón de expresión del gen de la miostatina en pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) durante el desarrollo embrionario, larvario y juvenil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Aislar, secuenciar y caracterizar la región codificante del gen de miostatina en pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) mediante análisis *in silico*.
- 2.- Cuantificar el nivel de expresión de la miostatina durante el desarrollo embrionario, larvario y juvenil.
- 3.- Evaluar el patrón de expresión en el músculo y relacionarlo con el crecimiento en peso del pez.
- 4.- Cuantificar la expresión de la miostatina en diferentes tejidos.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Objetivo 1. Aislar, secuenciar y caracterizar la región codificante del gen de miostatina en pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) mediante análisis *in silico*.

3.1.1 Extracción de ARN y síntesis cDNA

El ARN total fue extraído de larvas completas y de tejido muscular de juveniles con Trizol (Invitrogen) con condiciones establecidas por el fabricante (Anexo1-B). Para eliminar cualquier contaminación por DNA genómico, las muestras de RNA se trataron con DNAsa I (Promega). Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis de cDNA, utilizando random primers, RNAsin y M-MLV (transcriptasa reversa) (Anexo1-A).

3.1.2 Diseño de oligos (primers)

Se realizaron alineaciones múltiples (ClustalW, Multalin) con secuencias ya reportadas en GenBank, por lo que se partió de estas secuencias para aislar el transcrito (Figura 3), diseñándose dos sets de oligos a partir de regiones conservadas con el programa PRIMER 3 (Rozen, S. & Skaletsky, H., 2000) (Tabla 1). Todos los primers diseñados fueron sintetizados por Sigma Aldrich. Con el set de oligos Fish-Mstn-F1 y Fish-Mstn-R1 se buscó obtener la región 5' del transcrito y con el set Fish-Mstn-F2 y Fish-Mstn-R2 la región 3'.

Tabla 1. Características de los oligos utilizados inicialmente para amplificar el transcrito 3.1 de miostatina.

Oligo	Longitud	Tm	% GC	Secuencia
Fish-Mstn-F1	24	68.8	29.1	5'- AAT GCA TCT GWC KCA SRT YRT GMT -3'
Fish-Mstn-R1	20	69	55	5'- ATC AGG CGG GAG ATY TGC AG -3'
Fish-Mstn-F2	20	60.5	55	5'- CTG CAR ATC TCC CGC CTG AT -3'
Fish-Mstn-R2	21	54.6	47.6	5'- AGC AYC CRC ARC GGT CYA CYA -3'

F=foward; R= reverse, Tm= melting temperatura, %GC = porcentaje de guanina y citosina, W=A o T, K=G o T, S=C o G, R=A o G, Y=C o T, M=A o C.

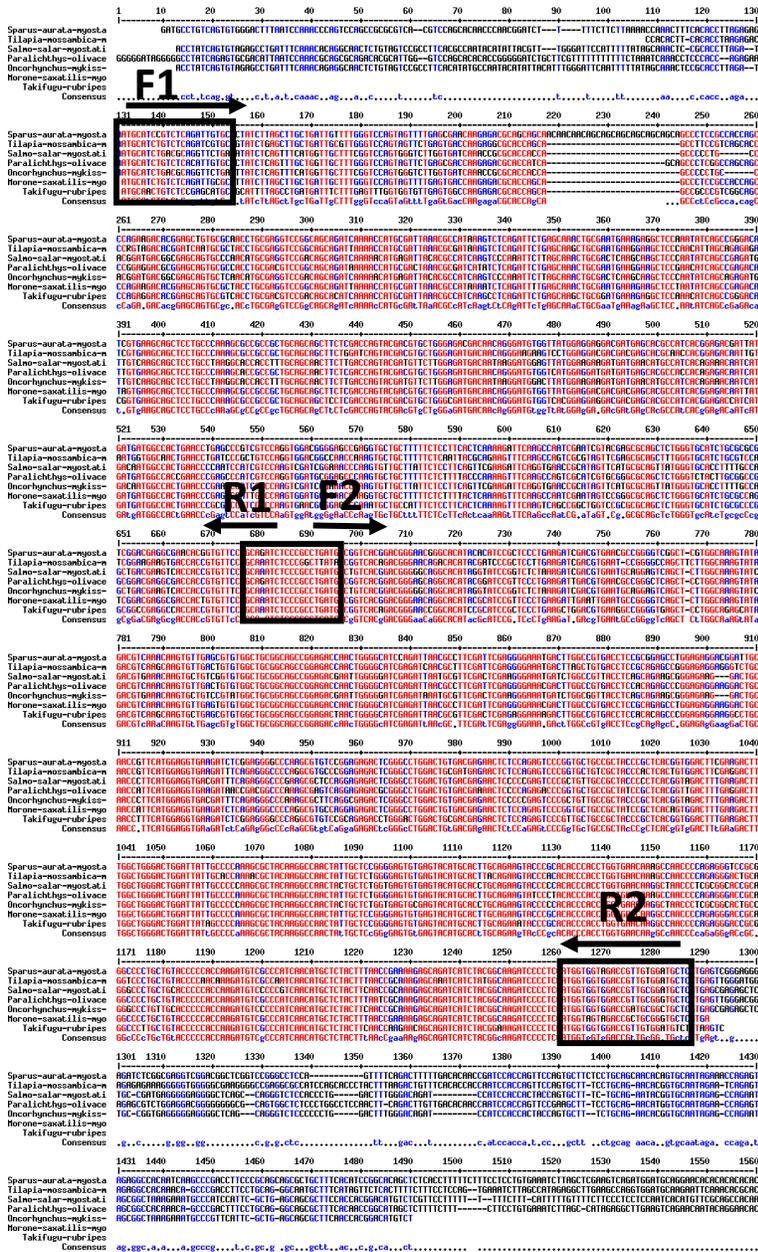


Figura 3. Alineaciones múltiples (Multalin) del gen de miostatina.

3.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando la polimerasa GoTaq® Flexi de Promega, en un termociclador PCR Sprint Thermal Cycler. Preparando una mezcla maestra, que se calcula dependiendo del número de muestras que se van a utilizar, llegando a un volumen final de 12.5µl. La preparación de la mezcla se

realiza en una gradilla previamente congelada y los reactivos se agregan en el orden que muestra la tabla 2, con las respectivas cantidades señaladas.

Tabla 2. Reactivos y cantidades para PCR

Solución	1x	Concentración final
Agua destilada	8.48	
25 mM MgCl ₂	0.75	1.5 Mm
2.5 mM de dNTPs	0.66	0.132 Mm
10x Buffer	1.25	1X
Primer F 250 µg/ml	0.13	0.4 µM
Primer R 250 µg/ml	0.13	0.4 µM
Taq polimerasa	0.1	0.5 U

El set de oligos Fish-Mstn-F1 y Fish-Mstn-R1 se utilizaron las siguientes condiciones:

Desnaturalización	94 °C 2 minutos	1 ciclo	
Desnaturalización	94 °C 1 minuto	} 40 ciclos	
Alineación	57 °C 1 minuto		
Extensión	72 °C 1 minuto		

Fish-Mstn-F2 y R2 amplificaron para la segunda parte del gen de miostatina de *L. guttatus*, bajo las condiciones:

Desnaturalización	94 °C 2 minutos	1 ciclo	
Desnaturalización	94 °C 1 minuto	} 35 ciclos	
Alineación	57 °C 1 minuto		
Extensión	72 °C 1 minuto		

Se corrieron geles de agarosa al 2% durante 30 minutos, 90v y 500mA, utilizando Φ x174 RF DNA/Hae III y 100bp DNA ladder como marcadores de peso molecular y visualizados bajo luz ultravioleta.

3.1.4 Aislamiento transcrito del gen de miostatina

Se cortaron y purificaron (Anexo1-C) sólo aquellas bandas que correspondían al tamaño del fragmento esperado, 500 a 600 pb. Para la purificación de las bandas seleccionadas, se utilizó kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega. Posteriormente, la ligación se llevó a cabo con el vector pGEMT Easy Vector y DNA T4 ligasa para unir el fragmento al vector (Anexo1-D). La transformación se realizó en bacterias competentes de *E. coli*, las cuales mediante choque térmico lograron incorporar el vector (Anexo1-E). Las bacterias se hicieron crecer en medio SOC, después sembradas en cajas petri con medio LB-ampicilina, X-GAL, dimetilformamida e IPTG, dejándolas incubar toda la noche a 37 °C. Una vez concluida la transformación se prosiguió al levantamiento de colonias que contenían el inserto (colonias blancas), para dejarlas incubar de nuevo a 37 °C con agitación en medio LB con ampicilina durante toda la noche (Anexo1-F). La obtención del plásmido se llevó a cabo por lisis alcalina (minipreps), utilizando RNAsa para eliminar la existencia de RNA y finalmente se re-suspendió el pellet en agua estéril (Anexo1-G). La digestión se efectuó con la enzima de restricción EcoR1 para evaluar cuales colonias contenían el inserto (Anexo1-H). La electroforesis de la digestión se llevó a cabo en gel de agarosa al 1% y como marcadores de peso molecular Φ x174 RF DNA/Hae III y λ DNA/Hind III.

Los plásmidos que contenían el inserto, fueron enviados a MacroGen Inc. 908 Word Meridian Venture Center (Corp. Korea) para su secuenciación en ambos sentidos (T7 y SP6).

3.1.5 Identificación y caracterización del transcrito del gen de miostatina

Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit y sometidas a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Zhang *et al.* 2000 &

Morgulis *et al.*, 2008) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para conocer la similitud de las secuencias con secuencias homólogas/ortólogas (BLASTn y BLASTx). Se obtuvo la traducción conceptual para la secuencia en los sitios de internet <http://insilico.ehu.es/translate/> y <http://bio.lundberg.gu.se/edu/translat.html>; la secuencia y su respectiva traducción fueron registradas en GenBank. Para la identificación de los sitios de intrones, se alineó el transcrito de *L. guttatus*, con el DNA genómico de *Lutjanus russellii* (JQ068866) ya reportado. Se identificaron sitios de procesamiento proteolítico con la secuencia de aminoácidos obtenida y los dominios conservados, pertenecientes a la familia de los Factores de Crecimiento transformante beta (TGF- β), obtenidas del sitio de internet http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_380448664.

Se elaboró un análisis para la medición de distancias euclidianas con el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages), y el modelo de Jukes Cantor. Las secuencias ortólogas de miostatina fueron obtenidas de NCBI (National Center for Biotechnology Information) y elegidas de acuerdo al análisis realizado por Rodgers & Garikipati (2008) para identificar la isoforma con que se está trabajando.

3.2 Objetivo 2. Cuantificar el nivel de expresión de la miostatina durante el desarrollo embrionario, larvario y juvenil.

3.2.1 Muestreo de organismos

El cultivo larvario se llevó a cabo en tanques de 6000 L, a una temperatura media de $30 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y a una salinidad de 35 ± 1.0 ups. Diariamente se registró la temperatura, salinidad, oxígeno, porcentaje de saturación de oxígeno. Las larvas se cultivaron bajo protocolos de trabajo desarrollados en la propia Unidad Mazatlán del Centro de Investigación Alimentación y Desarrollo (CIAD).

Las muestras se obtuvieron del lote de reproductores del laboratorio de reproducción de peces marinos de CIAD Unidad Mazatlán. El desove y fertilización

de manera natural se llevó a cabo a las 00:00 h del 4 de julio de 2012. Durante la etapa de desarrollo embrionario se recolectaron 6 muestras a las 10hrs y otras 6 muestras a las 14hrs después de fertilización, que corresponden a la etapa de segmentación y formación de órganos internos y aleta caudal del embrión, respectivamente.

Se reportó eclosión alrededor de las 20:00 del mismo día (4 julio de 2012), tomándose como el día 0 pos eclosión (dpe), iniciando así el desarrollo larvario. La etapa larvaria abarca desde el día de la eclosión hasta que en los organismos se cambia su alimentación, es decir, durante la larvicultura se les proporciona alimento vivo (microalgas, rotíferos, nauplios de *Artemia* y Metanauplios de *Artemia* enriquecidos) y una vez que esta cambia totalmente ha alimento balanceado, concluye la etapa larvaria (42dpe). Durante este periodo se realizaron muestreos cada 7 días (0, 7, 14, 21, 28 y 42 dpe), recabando aproximadamente 100 µl por muestra, cuando los organismos eran muy pequeños y dos organismos por muestra cuando ya alcanzaron aproximadamente 1 cm, en total seis muestras cada día de colecta.

Después de los 42dpe, los organismos fueron cultivados en tanques de 5000 L, con flujo de 40lit/min y alimentados al 20% de su biomasa. El muestreo del desarrollo juvenil inició, cuando a los organismos sólo se les suministraba alimento balanceado. Durante esta etapa, se recolectaron 36 organismos por cada día de muestreo, realizando pools de dos organismos, obteniendo un total de 18 muestras por día de colecta, los muestreos se realizaron cada siete días, igual que en el desarrollo larvario, hasta los 91dpe, una vez que alcanzaron aproximadamente los 20g.

A los peces colectados durante la etapa juvenil, se les registró su longitud total con un ictiómetro y el peso húmedo utilizando una balanza analítica. Posteriormente los organismos fueron sacrificados mediante hipotermia, usando hielo, lavados con agua destilada para remover el exceso de sales y finalmente almacenados en RNAlater (Ambion) para el trabajo molecular.

3.2.2 Diseño de oligos (primers) para el análisis de expresión génica por PCR en tiempo real (qPCR) y análisis de genes de referencia

Para la cuantificación de la expresión génica de miostatina, se diseñaron oligos específicos de la secuencia de miostatina obtenida para la especie (*L. guttatus*), con el programa PRIMER 3 (Rozen & Skaletsky, 2000), que amplifican un fragmento de 154pb, ubicado en la región 3' (Tabla 3).

La cuantificación relativa de la expresión de un gen, en este caso, miostatina, depende de los genes de referencia, para la normalización de los niveles de ARNm del gen de interés, por lo que se asume que la expresión de los genes de referencia es constante entre diferentes tratamientos, estadios y/o tejidos (Llera-Herrera *et al.*, 2012). Los genes de referencia son llamados genes constitutivos porque se requieren para el mantenimiento de las funciones básicas de la célula y se expresan de manera constante, a diferencia de otros genes que varían dependiendo de condiciones experimentales y/o biológicas (Llera-Herrera *et al.*, 2012).

Los genes de referencia en el estudio fueron seleccionados de acuerdo a Vandesompele *et al.* (2002) y a Andersen *et al.* (2004). Se eligieron dos genes de referencia para la normalización de la expresión génica, 18S rRNA y β -actina. Para 18S ribosomal, existen publicados oligos específicos para pargo flamenco por Galaviz *et al.* (2012) (Lg18S-F, 5'CTGAACTGGGGCCATGATTAAGAG3' y Lg18S-R, 5'GGTATCTGATCGTCGTCGAACCTC3'). Con respecto a β -actina, se diseñaron oligos a partir de regiones conservadas de distintas especies de peces, amplificando un fragmento de 166 pb. (Tabla 3). Con los tres sets de primers diseñados para PCR en tiempo real (miostatina, 18S ribosomal y β actina) se realizó PCR de punto final para verificar la amplificación del fragmento esperado.

Tabla 3. Oligos específicos para qPCR

Oligo	Longitud	Tm	% GC	Secuencia
qPCR-Lg-Mstn-F2	20	65.0	60.0	5'- T CCG CTC CCT GAA GAT CGA C -3'
qPCR-Lg-Mstn-R2	20	65.1	60	5'- G TCA CGG CCA AGT CGT TTC C -3'
Lg-βactina-F1	18	65.9	66.7	5'- CCA CGC CAT CCT GCG TCT -3'
Lg-βactina-R1	22	65.7	59.09	5'- CTG GAC TTC GAG CAG GAG ATG G -3'

F=foward; R= reverse, Tm= melting temperatura, %GC = porcentaje de guanina y citosina.

Se realizaron curvas estándar para los tres genes, las cuales relacionan el valor del ciclo umbral (Ct) en tiempo real con el número de copias en la muestra (diluciones seriadas), para el cálculo de la eficiencia de amplificación, utilizando la siguiente fórmula, publicada por Llera-Herrera *et al.*, (2012) basado en Bustin *et al.* (2009):

$$E = (10^{-1/\text{pendiente}} - 1) \quad (1)$$

El análisis de estabilidad de los genes de referencia (genes constitutivos) se efectuó con el software Housekeeping genes for qPCR, (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>), el cual utiliza cinco métodos que evalúan la estabilidad de expresión con los genes de referencia, en este caso 18S ribosomal y β-actina. Los cinco métodos utilizados por el software son Delta CT, Normfinder, BestKeeper, Comprehensive Ranking y Genorm.

3.2.3 Extracción de ARN para análisis por qPCR

El ARN total fue extraído por el mismo proceso ya mencionado en el objetivo 1. El cDNA fue sintetizado utilizando la enzima transcriptasa reversa MMLV (Promega) en presencia de “random primers” (detalles de protocolos en Anexos I-A y B).

3.2.4 PCR punto final

Par verificar la integridad del cDNA, después de cada síntesis de las muestras, se efectuó PCR de punto final, con los oligos utilizados para qPCR (Lg18S-F - Lg18S-R, Lg-βactina-F1 - Lg-βactina-R1 y qPCR-Lg-Mstn-F1 - qPCR-

Lg-Mstn-R2), con una desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 60°C 1 minuto y 72 °C por 1 minuto, como temperaturas de alineación y extensión respectivamente. Observando amplicones menores o iguales a 200pb en un gel de agarosa al 2%.

3.2.5 Cuantificación de la expresión génica por qPCR

Se llevó a cabo por PCR en tiempo real en un termociclador CFX96 de Bio-Rad, el cual utiliza un colorante fluorescente (Eva Green®) que se intercala entre el DNA de doble cadena, emitiendo fluorescencia, así, entre más DNA de doble cadena se genere, mayor será la fluorescencia emitida, proporcionando como datos de salida los valores CT (treshold cycle) o Cq (quantification cycle) por sus siglas en inglés, siendo el ciclo al cual inicia la fase exponencial de la amplificación.

Se empleó el reactivo Eva Green® de Bio-Rad para la reacción de PCR tiempo real (qPCR) mediante la preparación de una mezcla maestra (Tabla 4). De cada muestra se analizaron dos réplicas de cada gen, utilizando 1 µl de cDNA, llegando a un volumen final de 5 µl en la reacción, para la cuantificación de 18S ribosomal y β-actina se utilizaron diluciones seriadas 1:10 de cDNA. Las condiciones empleadas para la reacción son 95 °C por 30 segundos para la desnaturalización inicial, 95 °C por 20 segundos y 60 °C por 20 segundos para alineación/extensión, estos dos últimos pasos por 40 ciclos.

Tabla 4. Mezcla maestra para qPCR

Solución	Reacción 1X
Agua libre de nucleasas	1.3µl
Eva Green Super Mix 2x	2.5µl
Primer F	0.3µl
Primer R 250 µg/ml	0.3µl
Volumen total	4µl

En el cálculo de la expresión relativa de miostatina, se siguió el procedimiento utilizado por Sifuentes-Romero *et al.* (2010) con base al método de CT comparativo ($2^{-\Delta CT}$) propuesto por Livak & Schmittgen (2001), linearizando los datos de expresión génica y empleando β -actina para la normalización de la expresión.

El análisis se llevó a cabo considerando los lineamientos establecidos en las guías MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) (Bustin *et al.*, 2009; Bustin, 2010).

3.2.6 Análisis estadísticos

A los datos obtenidos de expresión génica se aplicó la transformación de raíz cuadrada para lograr normalidad y homocedasticidad (Meuwissen & Goddard, 2003, Smyth *et al.*, 2002), de esta manera fue posible realizar análisis de varianza de una vía (ANOVA) y comparaciones pareadas de Fisher (LSD) en las edades que se encontró diferencias significativas

3.3 Objetivo 3. Evaluar el patrón de expresión en el músculo y relacionarlo con el crecimiento en peso del pez.

Para evaluar diferencias significativas en el crecimiento de los organismos durante el desarrollo juvenil, se realizaron dos Análisis de Varianza de una vía Kruskal-Wallis y comparaciones pareadas con el método de Dunn, una para peso y otra para talla.

Para los datos de expresión génica se continuó utilizando la transformación de los datos ya mencionado en el objetivo 2. Se aplicó análisis de correlación longitud (L_{tot}) –peso (P) (Spearman), posteriormente, esta relación se calculó con la fórmula:

$$P = a L_{tot}^b \quad (2)$$

Donde P = peso del organismo (g); L_{tot} = longitud total del organismo (mm); a = ordenada al origen o factor de condición; b = pendiente de la curva o coeficiente de alometría, que indica el tipo de crecimiento del organismo, cuando b es cercano a 3, se considera que el crecimiento se considera isométrico y cuando se aleja de este valor es alométrico, es decir, el crecimiento en peso y talla varía de la proporción 1 a 3 (Herández-Montaña, *et al.*, 2006; Andrade-Tinoco & Espino-Barr, 2006; Sparre & Venema, 1995; Pauly, 1983) y finalmente se evaluó la correlación expresión de miostatina-peso (Pearson).

Se comparó la existencia de diferencias significativas en la expresión de miostatina en dos grupos de peso: grupo 1, correspondiente a los organismos con peso menor a la media y grupo 2, organismos con pesos mayores a la media. Posteriormente se subdividieron tres grupos de peso por debajo de la media y tres grupos de peso por encima de la media, para determinar diferencias en la expresión de miostatina con respecto al peso de los organismos, aplicándose una ANOVA de una vía, con comparaciones pareadas Fisher, en los casos donde se encontró diferencias significativas.

Se evaluó la existencia de diferencias significativas en los niveles de expresión y entre grupos de peso durante el desarrollo juvenil, realizando un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y una prueba de comparaciones pareadas de Fisher (LSD) en los casos que se encontraron diferencias significativas entre los factores (edad vs niveles de expresión de miostatina) abarcando el desarrollo embrionario, larvario y juvenil.

3.4 Objetivo 4. Cuantificar la expresión de la miostatina en diferentes tejidos

3.4.1 Muestreo de organismos

Se realizó un muestreo de tejidos, en ocho organismos de 194 dpe. Cada uno fue lavado con agua destilada para remover el exceso de sales y sacrificados

por hipotermia. Los tejidos que se extrajeron fueron: vejiga natatoria, riñón, branquia, intestino, hígado, cerebro, corazón, estómago, ojo y músculo. Durante las disecciones los organismos se mantuvieron en hielo para evitar la rápida degradación del RNA. Una vez colectado el tejido se conservó en RNA later para su trabajo molecular

3.4.2 Extracción de ARN y síntesis de cDNA

Se realizó semejante a la descrita en los objetivos 1 y 2.

3.4.3 Diseño de oligos (primers) para el análisis de expresión génica por PCR en tiempo real y análisis de genes de referencia

Los oligos utilizados para la cuantificación de la expresión génica fueron los mismos mencionados en el objetivo 2, así como los procedimientos de análisis de estabilidad de genes de referencia, realizándose para cada órgano.

3.4.4 PCR punto final

Se realizó PCR punto final a cada extracción y síntesis de cDNA con los protocolos y condiciones descritas en el objetivo 2.

3.4.5 Cuantificación de la expresión génica por qPCR

Se efectuó de la misma manera al protocolo mencionado en el objetivo 2. Para la normalización de la expresión génica se utilizó el gen β -actina.

3.4.6 Análisis estadísticos

Se aplicó un Análisis de Varianza de una vía con comparaciones pareadas Fisher (LSD) entre todos los órganos obtenidos, para evaluar la existencia de diferencias significativas en los niveles de expresión de miostatina.

3.4.7 Aislamiento transcrito del gen de miostatina en órganos

Utilizando los oligos diseñados para obtener el transcrito de miostatina descrito en el objetivo 1 (Fish-Mstn-F2 y Fish-Mstn-R2), se buscó aislar el

transcrito en tejidos no musculares que expresen la miostatina como cerebro, branquia y ojo, con la finalidad de determinar si se trata de la misma isoforma de miostatina. Las condiciones y protocolos de amplificación, purificación, clonación, secuenciación, identificación y caracterización de los transcritos encontrados en cerebro y branquia se efectuaron de la misma manera que los descritos en el objetivo 1.

Como el cerebro presentó los niveles más altos de expresión de miostatina, aunado a que se ha reportado una segunda isoforma de miostatina en este órgano, se decidió aislar primero el transcrito cerebral. Para la obtención del transcrito completo de miostatina en cerebro se utilizó la técnica de SMARTER™ RACE cDNA (SMART RACE cDNA amplification) de Clontech, en la cual primero se sintetiza cDNA RACE, a partir de RNA, al cual se le incorpora un oligo químicamente modificado a cada extremo de la secuencia, uno para 5' y otro para 3'. Posteriormente se llevó a cabo la reacción de PCR RACE, con oligos específicos de la secuencia que se busca y oligos universales del kit RACE. Las condiciones utilizadas fueron una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, posteriormente 95°C 30 segundos, 66°C 30 segundos, 68°C 3 minutos, por 30 ciclos y una extensión final a 68°C por 10 minutos. Una vez obtenido el producto de PCR, se diluyó en buffer de tricina-EDTA (5µl de producto de PCR RACE en 245µl de buffer de tricina-EDTA) para efectuar una reacción de PCR anidado (Nested), con 30 segundos a 94°C, 65°C 30 segundos y 68°C 3 minutos, 23 ciclos. Los fragmentos obtenidos 5'-RACE y 3'-RACE de cada tejido fueron clonados y enviados a Macrogen para su secuenciación (Anexos 1-J, K, L)

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Objetivo 1. Aislar, secuenciar y caracterizar el transcrito completo del gen de miostatina en pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) mediante análisis *in silico*.

El par de oligos Fish-Mstn-F1 y Fish-Mstn-R1 amplificaron un fragmento de alrededor de 550 pb, utilizando dos muestras (A – B) de cDNA de pargo flamenco (Figura 4), de las cuales se obtuvo la región 5' de la región codificante del gen de miostatina, con 552 pb correspondiente a 184 aminoácidos del propéptido (Figura 5).

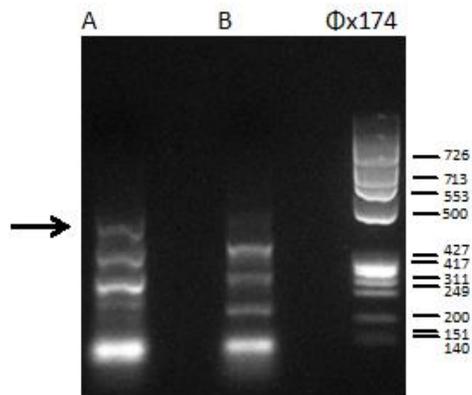


Figura 4. PCR Fish-Mstn F1 y R1 fragmento 5'. La flecha indica la banda seleccionada para corte y purificación

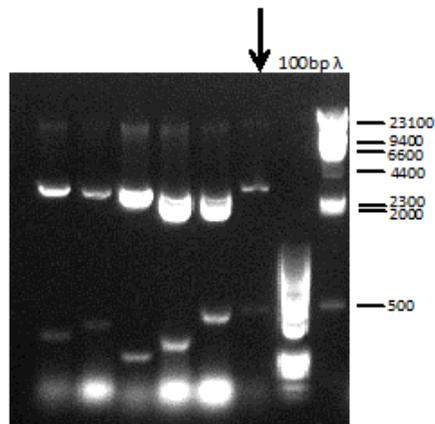


Figura 5. Digestión del plásmido Fish-Mstn-F1 Y R1. La flecha indica la clona que posee el fragmento del gen de miostatina.

Para la región 3', utilizando los oligos Fish-Mstn-F2 y R2, se amplificaron fragmentos de alrededor de 600 pb, los cuales fueron purificados, clonados y secuenciados, logrando obtener la secuencia que corresponde al péptido activo y parte del pro-péptido de 614 pb (Figuras 6 y 7).

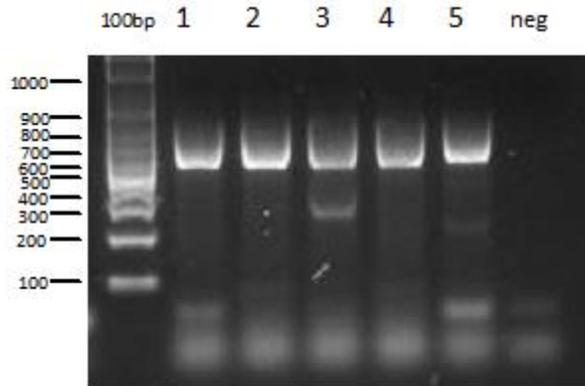


Figura 6. PCR Fish-Mstn-F2 y R2 fragmento 3'.

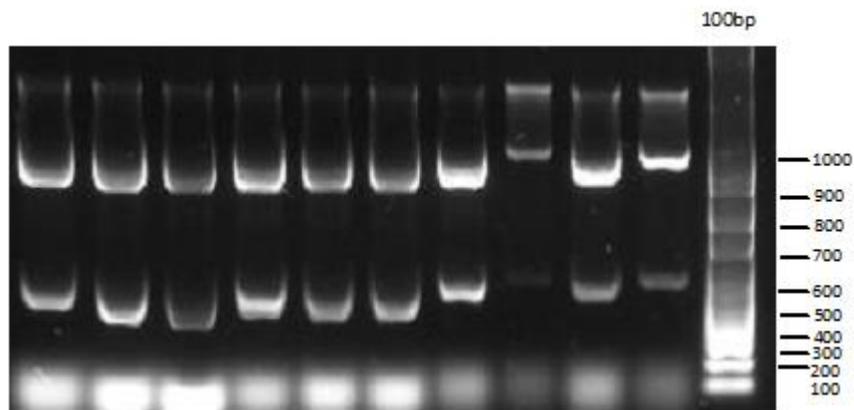


Figura 7. Digestión del plásmido Fish-Mstn F2 y R2. Todas la clonas posee el fragmento de miostatina.

Por lo tanto, la región codificante para *L. guttatus* del gen de miostatina cuenta con 1134 pb a partir del codón de inicio (ATG) y la traducción de la proteína de 377 aminoácidos. La secuencia y la traducción conceptual se registraron en GenBank con el número de acceso JX987064 (Figura 8).

1 AUGCAUCUGACGCAGGUUGUGCUGUAUGUUAGCCUGCUCAUUGCUUUGGGUCCAGUAGUU 60
M H L T Q V V L Y V S L L I A L G P V V
61 CUGAGUGACCAAGAGACGCACCAGCAGCAGCAGCCUCCGCCAGCAGCCAGUGGACACG 120
L S D Q E T H Q Q Q Q P S A S S P V D T
121 GAGCAGUGCGCUACCUGCGAGGUCCGGCAGCAGAUUAAAACCAUGCGACUAAACGCCAUC 180
E Q C A T C E V R Q Q I K T M R L N A I
181 AAGUCUCAGAUUCUGAGCAAACUGCGGAUGAAAGAAGCUCCAAACAUCAGCCGAGACAUC 240
K S Q I L S K L R M K E A P N I S R D I
241 GUGAAGCAGCUCCUGCCCAAAGCGCCGCCGUGCAGCAGCUUCUGACCAGUACGACGUG 300
V K Q L L P K A P P L Q Q L L D Q Y D V
301 CUGGGAGAUGAUAACAGGGAUGUGGUCAUGGAGGAGGACGAUGAGCAUGCCAUCACGGAG 360
L G D D N R D V V M E E D D E H A I T E
361 ACGAUAUAUGAUGGACCUGGACCCGAGGCCAUCGUCCAGGUGGAUGGGGAACCAAGG 420
T I M M M A T G P E A I V Q V D G E P R
421 UGCGUCUUUUUCUUUUACUCAAAAGUUUCAAGCCAAUCGCAUAGUCCGAGCGCAGCUC 480
C C F F S F T Q K F Q A N R I V R A Q L
481 UGGGUGCAUCUGCGCGCGGGGAGGAGCGACCACGGUGUCCUGCAGAUCUCCGCCUG 540
W V H L R A A E E A T T V F L Q I S R L
541 AUGCCGGUCACAGACGGGAACAGGCACAUACGCAUCCGCUCCUGAAGAUCGACGUGAAC 600
M P V T D G N R H I R I R S L K I D V N
601 GCCGGGGUCAGCUCUUGGCAAAGUAUAGACGUCAAACAAGUGUUGAGCGUGUGGCUGCGG 660
A G V S S W Q S I D V K Q V L S V W L R
661 CAGCCGGAGACCAACUGGGCAUCGAGAUUAACGCCUUCGAUUCGAGGGGAAACGACUUG 720
Q P E T N W G I E I N A F D S R G N D L
721 GCCGUGACCUCGCGAGACCCGGAGAGGAAGGGCUGCAACCGUUCUUGGAGGUGAAGAUC 780
A V T S A E P G E E G L Q P F M E V K I
781 UCAGAGGGCCCCAAGCGUGCAAGGAGAGACUCAGGUCUGGACUGUGACGAGAACUCUCCA 840
S E G P K **R A R R** D S G L D **C** D E N S P
841 GAGUCCCGUUGCUGCCGUUACCCGUCACAGUGGACUUUGAAGACUUUGGCUGGGACUGG 900
E S R **C** **C** R Y P L T V D F E D F G W D W
901 AUUAUUGCCCCAAAGCGCUACAAGGCCAACUAUUGCUCCGGGAGUGUGAGUACAUGCAC 960
I I A P K R Y K A N Y **C** S G E **C** E Y M H
961 UUGCAAAGUACCCACACACCACCCUGGUGAACAAGCCAACCCAGAGGGACCGCUGGC 1020
L Q K Y P H T H L V N K A N P R G T A G
1021 CCUGCUGUACCCCAACAAGAUGUGCGCCCAUCAACAUGCUCUACUUUAACCGAAAAGAG 1080
P **C** **C** T P T K M S P I N M L Y F N R K E
1081 CAGAUAUCUAUGGCAAGAUCUUUCAUGGUGGUGGACCGUGGGUGCUAA 1134
Q I I Y G K I P S M V V D R **C** G **C** *

Figura 8. Región codificante de miostatina para *L. guttatus* de 1134 pb y su traducción de 377 aminoácidos. En gris se indica la región de procesamiento proteolítico y las 9 cisteínas conservadas en el péptido activo.

La secuencia de miostatina de *L. guttatus*, presenta la mayor identidad (98%) con *Lutjanus russellii*, por pertenecer a la misma familia, un 97% de similitud con *Sciaenops ocellatus*, 96% con *Micropterus salmoides*, *Epinephelus coioides* y *Siniperca scherzeri*, un 92% con *Takifugu rubripes* y 88% con *Oreochromis mossambica*, por mencionar algunas.

La secuencia de aminoácidos posee la región de procesamiento proteolítico (RXRR), vital para la activación de la proteína, presente en los miembros de la Familia de Factores de Crecimiento Transformante beta (TGF- β) (Lee, 2010); esta región de procesamiento proteolítico es exactamente igual (RARR) a las reportadas en *Perca flavescens*, *Coryphaena hippurus*, *Euthynnus alletteratu* (Roberts *et al.*, 2001), *Oreochromis mossambicus*, *Morone chrysops* (Rodgers *et al.*, 2001), *Lateobrax japonicus* (Ye *et al.*, 2007) y *Oryzias latipes* (Sawatari *et al.*, 2010); aunque la secuencia de aminoácidos no es 100% idéntica, la zona de procesamiento proteolítico se conserva en todas las especies, como *Danio rerio* (Xu *et al.*, 2003), *Salvelinus fontinalis* (Roberts *et al.*, 2001), *Oncorhynchus mykiss* (Garikipati *et al.*, 2007), *Salmo salar* (Ostbye *et al.*, 2001), *Sparus aurata* (Maccatrozzo *et al.*, 2001), y *Homo sapiens* (Saunders *et al.*, 2006). En la región del péptido activo, se localizan nueve cisteínas, comunes en todos los miembros de la familia de TGF- β (Figura 8), estas cisteínas conservadas han sido encontradas en otras secuencias de miostatina reportadas anteriormente (Sawatari *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2007; Garikipati *et al.*, 2007; Garikipati *et al.*, 2006; Saunders *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2001, Ostbye *et al.*, 2001, Maccatrozzo *et al.*, 2001). Adicionalmente se encuentran dos cisteínas para la formación de monómeros en la proteína de latencia (LAP) y otras dos para la unión de dos regiones terminales bioactivas, en total cuatro cisteínas adicionales a las nueve conservadas; aunque los nueve residuos de cisteínas se encuentran en todos los miembros de TGF- β , contribuyendo a la formación de los característicos enlaces disulfuro intramoleculares, aún se desconoce si las cisteínas adicionales encontradas en la moléculas de miostatina participan en los enlaces disulfuro. Sin embargo, sólo se encuentran en los ortólogos de miostatina y no en otros miembros de TGF- β (Rodgers *et al.*, 2001).

La secuencia de nucleótidos obtenida cuenta con los dominios altamente conservados de la familia de Factores de Crecimiento Transformante beta (TFG- β), la cual consta de una región conocida como propéptido hacia el extremo 5' y el péptido activo hacia el extremo 3' (Figura 9).

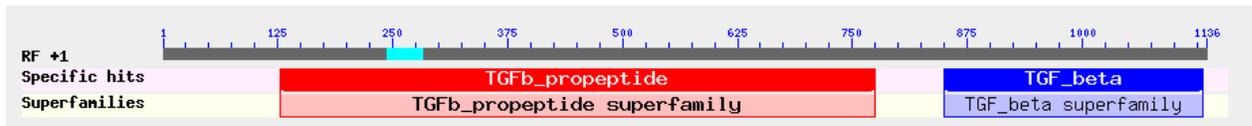


Figura 9. Sitios conservados del gen de miostatina perteneciente a la familia de Factores de Crecimiento Transformante beta (TGF- β)

Se encontraron tres exones y dos intrones, el primer exón posee una longitud de 385 nt, seguido del primer intrón de 353 nt de longitud, el segundo exón consta de 371 nt, el segundo intrón 700 nt y el tercer exón 381 nt. La figura 10 muestra la alineación con el ADN genómico de *Lutjanus russellii* (JQ068866) que se realizó para encontrar las zonas de intrones. Las uniones exón-intrón son altamente conservados entre otras especies de vertebrados, ya que se mantiene el mismo orden y número de exones e intrones.

De acuerdo al análisis filogenético realizado la secuencia obtenida de miostatina en *L. guttatus* corresponde al grupo de la miostatina 1 (Figura 11).

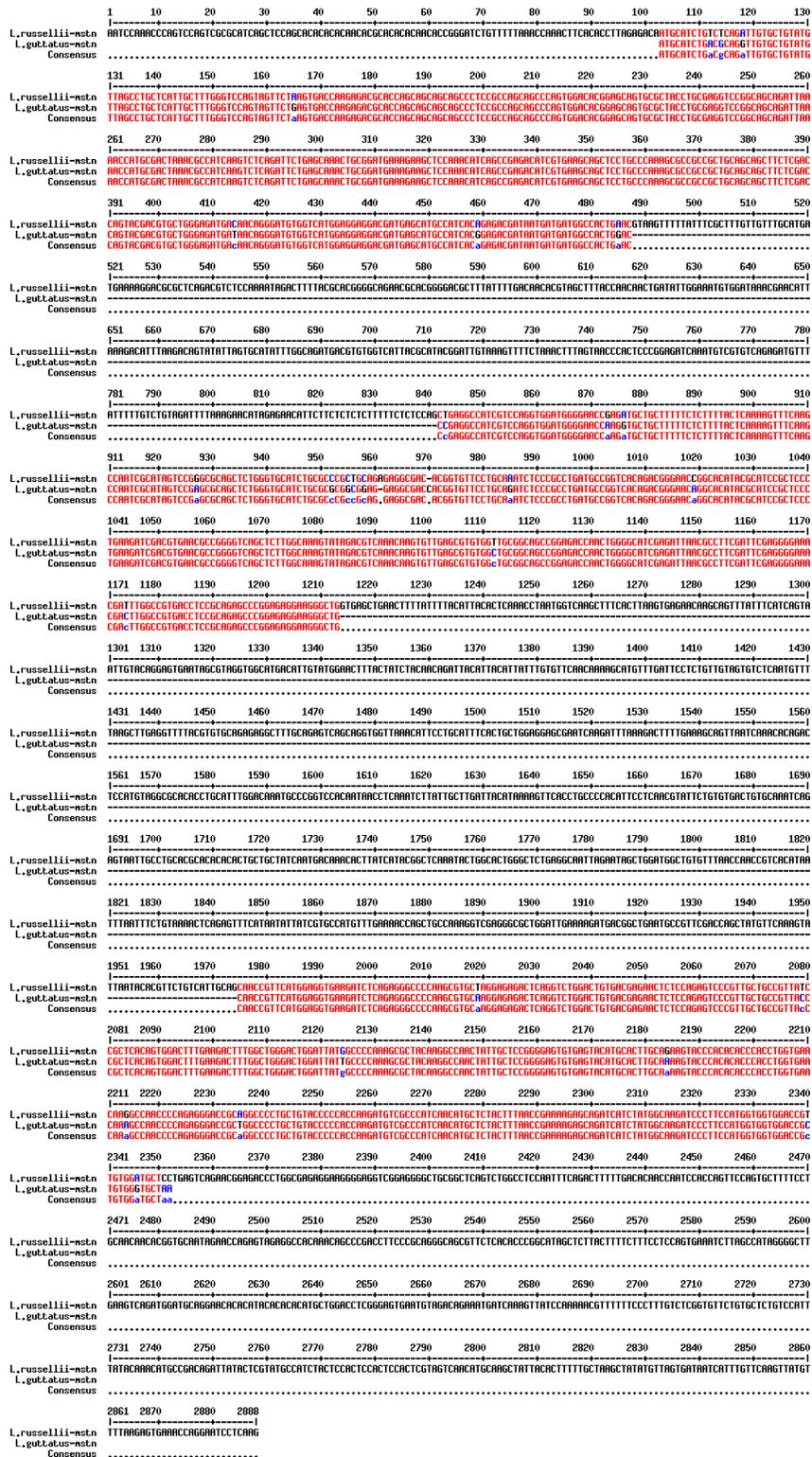


Figura 10. Alineación *L. russellii* (DNA genómico) y *L. guttatus* región codificante.

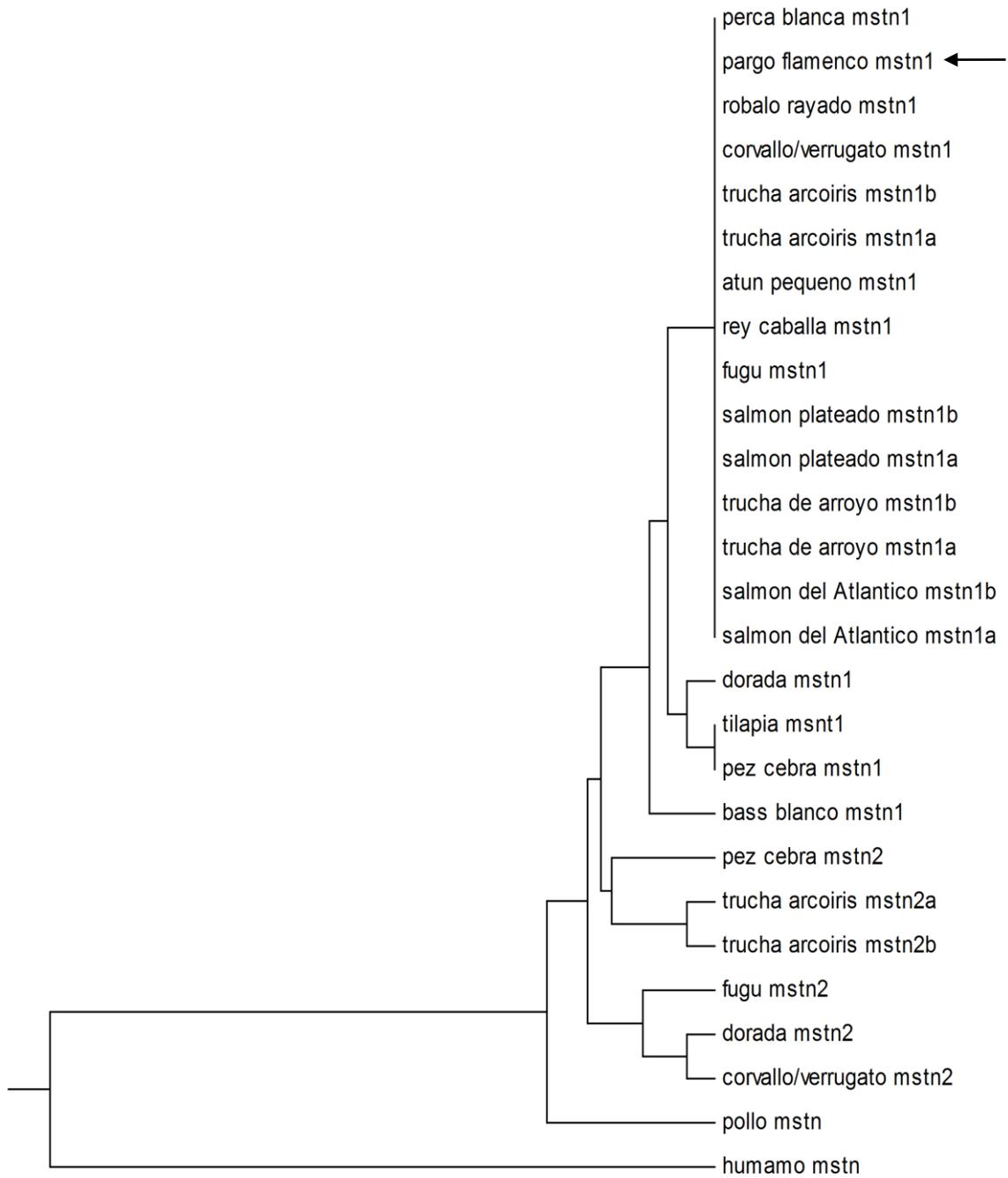


Figura 11. Árbol filogenético de secuencias ortólogas de miostatina. La parte superior agrupa la miostatina 1, la cual es muy conservada entre las diferentes especies de peces y la parte inferior muestra la miostatina 2, la cual presenta secuencias menos conservadas entre especies. Las secuencias de miostatina humana y pollo se utilizaron como grupos externos. La flecha indica la miostatina de *L. guttatus* que agrupa con la miostatina 1

4.2 Objetivo 2. Cuantificar el nivel de expresión de la miostatina durante el desarrollo embrionario, larvario y juvenil.

Para las curvas estándar en los tres genes (miostatina, 18S ribosomal, β -actina), se obtuvo R^2 de 0.99 (Tabla 5 y Figuras 12-13-14), mostrando que las amplificaciones fueron correctas. Las eficiencias obtenidas (ribosomal $e=0.81$, actina $e=1.05$ y miostatina $e=0.91$), demostraron que se cuenta con sensibilidad analítica y robustez en el análisis para β -actina y miostatina.

Tabla 5. Curva estándar 18S ribosomal, β -actina y mstn

Dilución	Log Copy Number	Ct 18S rRNA	Ct β -actina	Ct Mstn rRNA
1	0.00	25.93	30.19	39.07
5	0.70	-	-	35.93
10	1.00	21.49	26.95	35.08
50	1.70	-	-	32.38
100	2.00	18.06	23.34	31.38
500	2.70	-	-	29.35
1000	3.00	14.42	20.76	28.19
10000	4.00	9.56	16.78	-
100000	5.00	6.56	14.40	-

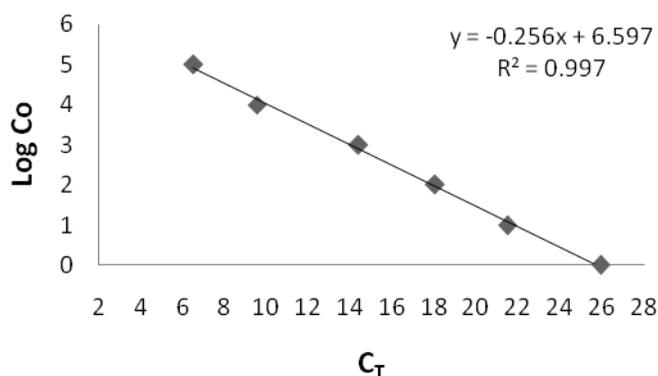


Figura 12. Curva estándar 18S ribosomal.

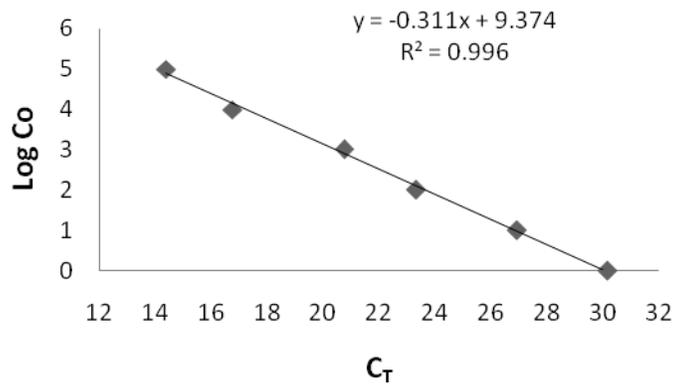


Figura 13. Curva estándar beta actina.

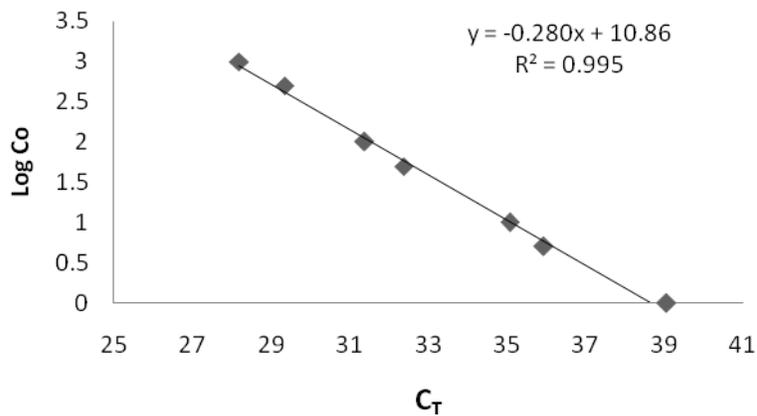


Figura 14. Curva estándar miostatina.

En el análisis de estabilidad de los genes de referencia, los métodos Delta CT, Normfinder y Genorm encuentran igual estabilidad en ambos genes, aunque dos de estos (Delta CT y Normfinder), colocan a β -actina como más estable (Figuras 14-16-17), mientras que los métodos Comprehensive Ranking y BestKeeper coinciden que β -actina presenta mayor estabilidad (Figuras 18-19). Una vez hecha la cuantificación de la expresión génica por el método delta Ct comparativo, se determinó trabajar sólo con β -actina debido a que mostró mayor eficiencia y que 4 de los 5 métodos lo reportan con mayor estabilidad.

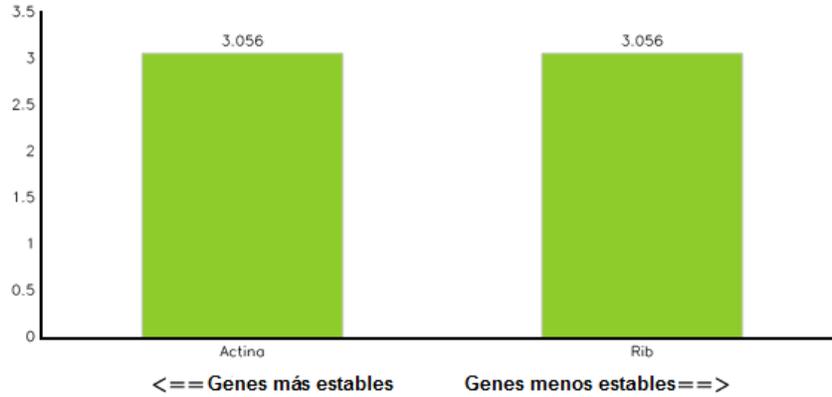


Figura 15. Método Delta CT para estabilidad de genes de referencia.
 El eje Y indica la estabilidad, hacia la izquierda corresponde genes más estables y hacia la derecha menos estables.

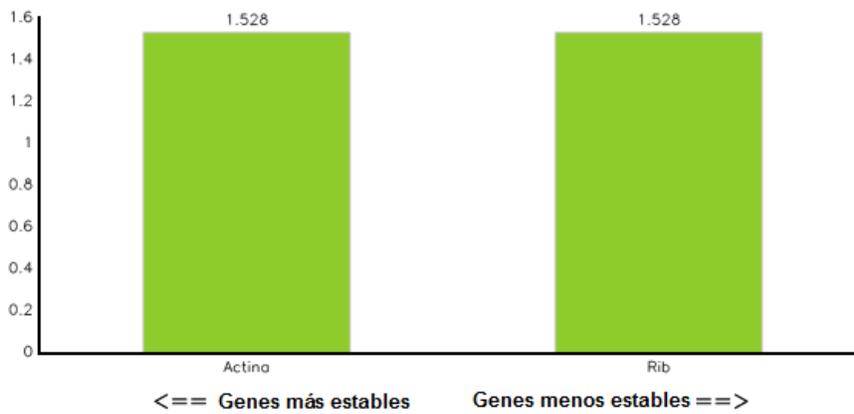


Figura 16. Método NormFinder para estabilidad de genes de referencia.
 El eje Y indica la estabilidad, hacia la izquierda corresponde genes más estables y hacia la derecha menos estables.

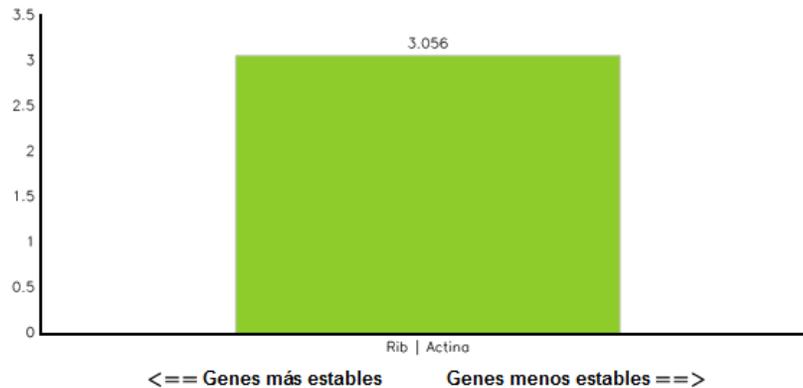


Figura 17. Método Genorm para estabilidad de genes de referencia.
 El eje Y indica la estabilidad, hacia la izquierda corresponde genes más estables y hacia la derecha menos estables.

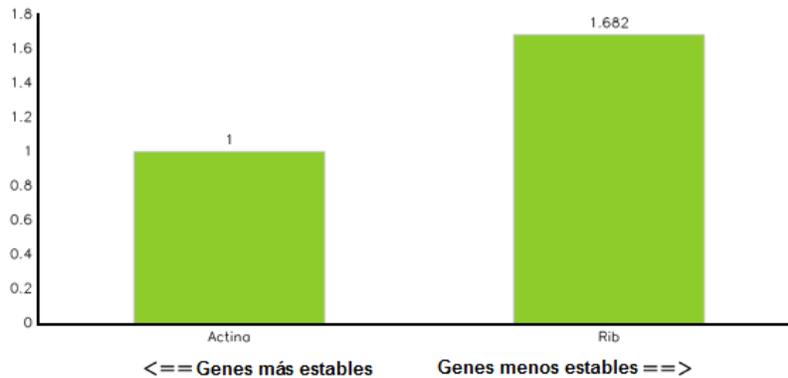


Figura 18. Método Comprehensive Ranking para estabilidad de genes de referencia.
El eje Y indica la estabilidad, hacia la izquierda corresponde genes más estables y hacia la derecha menos estables.

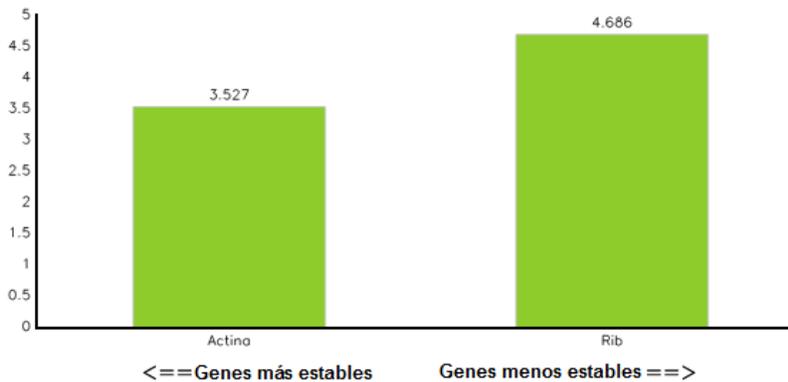


Figura 19. Método BesKeeper para estabilidad de genes de referencia.
El eje Y indica la estabilidad, hacia la izquierda corresponde genes más estables y hacia la derecha menos estables.

Una vez obtenidos los datos de Cq (Anexo2-1.1), normalizados, linearizados y finalmente aplicando la transformación de raíz cuadrada, se analizó primeramente el desarrollo embrionario y larvario (10 horas posfertilización (hpf)-42dpe) mediante el Análisis de Varianza de una vía (ANOVA 1 vía). En este análisis se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$, Anexo 2-1.2) en el 28, 35 y 42 dpe con respecto a los niveles basales 14 hpf y 0 dpe (Figura 20) (Anexo 2-1.3). Estos resultados indican que la miostatina se expresa en niveles basales desde las 14 hpf, debido al rápido crecimiento que presenta la especie en este periodo. A los 28 dpe, la expresión del transcrito de miostatina incrementa significativamente, manteniéndose en niveles elevados las semanas siguientes al

desarrollo larvario. Las diferencias de expresión entre estadios no se atribuyen a la calidad del ARN, ya que su integridad fue verificada con electroforesis de gen 18S rRNA.

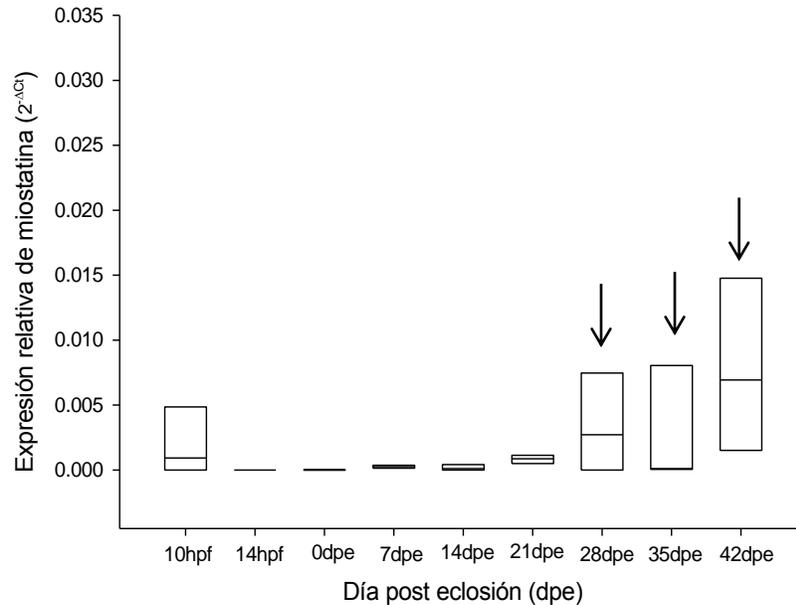


Figura 20. Expresión miostatina durante la etapa embrionaria y larvaria (10hrs a 42dpe). Las flechas indican diferencias significativas con respecto al nivel basal (14hpf-0dpe). Los extremos de cada caja representan del 25% al 75% de los datos, la línea en el centro de la caja representa la mediana.

El patrón de expresión de miostatina en peces al parecer es diferente al de embriones de ratón, donde los niveles de RNAm en el desarrollo de somitas es elevado, mientras que en peces es prácticamente indetectable. Esta diferencia se deba probablemente a la existencia del parálogo de miostatina que se encuentra en los teleosteos. Rescan y colaboradores en 2001, reportan que los niveles de RNAm de miostatina-1 en *Oncorhynchus mykiss* están presentes en la misma cantidad en el tronco de los embriones durante la eclosión y en el músculo de los alevines, similar al patrón de expresión que posee *L. guttatus*, sólo que los niveles de expresión son distintos.

Xu *et al*, (2003) encontraron bajos niveles de expresión de miostatina, prácticamente indetectables, en embriones de pez cebra y aparentemente la

expresión incrementa a las dos semanas de edad del pez (larva), en juveniles de un mes y músculo esquelético de adultos de tres meses, en comparación con embriones de cuatro días de esta misma especie. Sin embargo la comparación sólo es cualitativa ya que el análisis se realizó mediante RT-PCR. Helterline *et al.* (2007), analizaron con más detalle la expresión de miostatina-1 en pez cebra mediante qPCR, encontrando niveles elevados a las 4 horas pos-fertilización (hpf), los autores lo atribuyen a la transferencia materna, como ocurre en el pargo flamenco. La expresión del transcrito en pez cebra baja considerablemente, casi a niveles indetectables, cuando se encuentra en la etapa de gastrulación (7 hpf), coincidiendo de nuevo con el comportamiento observado en *L. guttatus*, donde se encontró expresión de miostatina a las 10 hpf, pero a las 14 hpf la expresión de miostatina fue prácticamente indetectable. Aunque posterior a la blastulación (después de 20 hpf) en pez cebra hay un incremento en el transcrito de miostatina, éste no fue observado en pargo flamenco, debido probablemente al rápido desarrollo embrionario (20 a 24 horas) y absorción del saco vitelino (que ocurre alrededor de 38 a 52 horas pos-eclosión) a diferencia de *Danio rerio* (desarrollo embrionario alrededor de 72hrs y absorción de saco vitelino de 4 a 5dpe). Algunos autores han sugerido que los cambios en la expresión de miostatina se deben a las diferencias en el desarrollo embrionario, por ejemplo en *L. calcarifer*, el desarrollo embrionario ocurre a un ritmo mucho más rápido que en el pez cebra (De Santis *et al.*, 2012), tal y como sucede en *L. guttatus*.

Lee, en 2007, describe que el efecto regulador que ejerce la miostatina en el crecimiento muscular se transfiere de madre a cría, así en especies de peces donde se ha medido la expresión de miostatina durante el desarrollo embrionario se ha encontrado expresión de miostatina antes de la formación de la blástula, atribuida a la transferencia materna, para posteriormente caer abruptamente (De Santis *et al.*, 2012; Helterline *et al.*, 2007; Vianello *et al.*, 2003). Los patrones de expresión del gen de miostatina en peces indican que podría estar involucrado en estadios tempranos del desarrollo muscular (Helterline *et al.*, 2007). Este supuesto fue puesto a prueba con el bloqueo de la miostatina-1 en pez cebra, mediante morfolidos antisentido; donde se encontraron diferencias fenotípicas significativas

en las etapas de 18 y 20 hpf; donde la longitud y ancho de los somitas se incrementó considerablemente, concluyendo que la miostatina juega un papel importante durante la miogénesis, tanto en la inhibición de la proliferación celular, como en la diferenciación (Amali, *et al.*, 2004). Esto es sorprendente debido a los niveles tan bajos de expresión de miostatina durante el desarrollo embrionario (Helterline *et al.*, 2007).

Por otro lado, *Lates calcarifer* presenta altos niveles de expresión de miostatina alrededor de la eclosión (De Santis *et al.*, 2012), diferente a lo encontrado en *Lutjanus guttatus*, donde la expresión de miostatina se mantiene en niveles basales. Estos resultados probablemente se deban a las diferencias en el patrón de crecimiento de ambos peces, es decir, a los desfases de tiempo que pudieran tener, ya que a las 3 horas después de eclosión, la expresión de miostatina en *L. calcarifer* disminuye, posteriormente aumenta considerablemente hasta las 30 horas pos eclosión, para después disminuir de nuevo, manteniéndose en niveles mínimos, por la alta tasa de crecimiento reportada en este periodo. A los 21 dpe, los autores reportan finalmente incremento en la expresión del transcrito, similar al que se encontró para *L. guttatus* a los 28 dpe, donde existe aumento significativo de la expresión de miostatina y cercanos al periodo donde las larvas de ambas especies entran en metamorfosis (De Santis *et al.*, 2012, Álvarez-Lajonchère *et al.*, 2012), siendo este periodo un factor de estrés en las larvas (Álvarez-Lajonchère *et al.*, 2012), indicando que en peces los patrones de expresión son similares, con sus respectivas diferencias entre especies y coincidiendo probablemente con la finalización de una de las etapas de crecimiento por hiperplasia en peces, donde el músculo adquiere al aspecto típico de “mosaico” (Rescan, 2005; Rowleron & Veggetti, 2001).

Por lo tanto, como ya fue mencionado por Rodgers *et al.* (2001), la miostatina no se expresa constitutivamente en el desarrollo de las larvas, su expresión parece ser regulada, sugiriendo también que la expresión de miostatina aumenta con el inicio de la actividad muscular en el desarrollo de las larvas, y por lo tanto, el desarrollo muscular.

Otro análisis de varianza de una vía, aplicado en el desarrollo juvenil de *L. guttatus* (49-91 dpe) encuentra diferencia significativa ($P < 0.05$) (Anexo 2-1.4) en los días 49, 56, 63 y 84 con respecto al día 70; el 63dpe muestra diferencia con respecto a todos los días incluidos en el análisis (Figura 21 y Anexo 2-1.5).

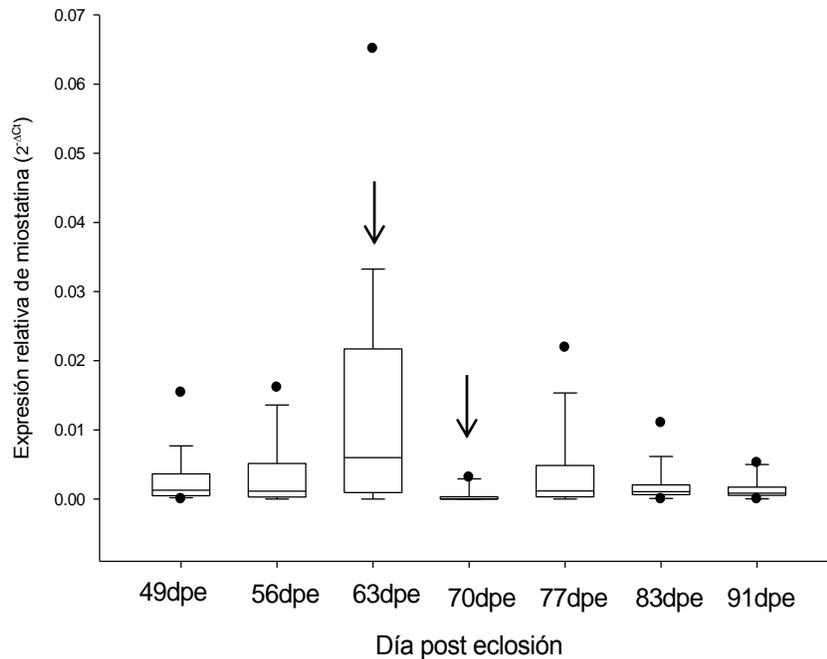


Figura 21. Expresión miostatina durante la etapa juvenil (49 a 91 dpe). La flecha indica diferencia significativa en los niveles de expresión con respecto a los demás días. Los extremos de cada caja representan del 25% al 75% de los datos, la línea en el centro de la caja representa la mediana, las líneas que se extienden de las cajas simbolizan los valores máximos y los puntos valores atípicos.

De igual manera un análisis de varianza de una vía se aplicó para todos los estadios en conjunto (10 hpf-91 dpe) en donde también se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) (Anexo 2-1.6). El día 63 presentó diferencia significativa con todos los días incluidos en el análisis a excepción del día 42. De manera relevante los días 42, 56, 63 y 77 mostraron diferencia significativa con respecto a los valores basales (14 hpf-0 dpe y 70 dpe), mientras que los días 28 y 49 sólo presentaron diferencia significativa con 14 hpf (Figura 22 y Anexo 2-1.7). De esta manera podemos describir los días de mayores y menores niveles de expresión de miostatina durante el desarrollo embrionario, larvario y juvenil de *L. guttatus*, lo

que probablemente se deba a una retroalimentación negativa en la vía señalización de la miostatina.

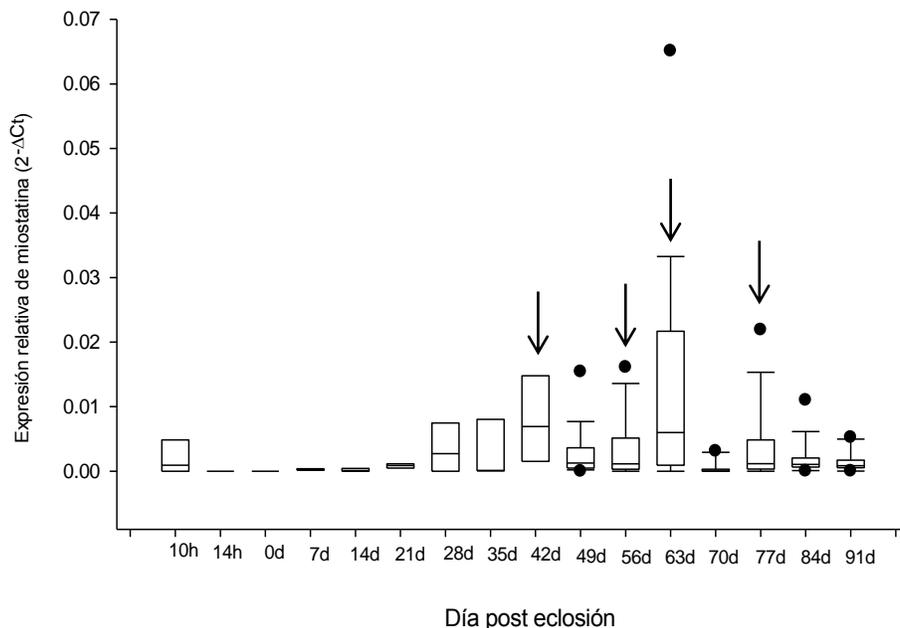


Figura 22. Expresión miostatina durante la etapa embrionaria, larvaria y juvenil. Las fechas indican diferencias significativas en los niveles de expresión con respecto al nivel basal (14hpf y 0dpe). Los extremos de cada caja representan del 25% al 75% de los datos, la línea en el centro de la caja representa la mediana, las líneas que se extienden de las cajas simbolizan los valores máximos y los puntos valores atípicos.

La tendencia de los datos indica que la expresión de miostatina en *L. guttatus* inicia desde el desarrollo embrionario, como se ha descrito para otras especies de peces (Roberts & Goetz, 2003, Helterline *et al.*, 2007, De Santis *et al.*, 2012), sin embargo en el día 28 es cuando se observa un incremento significativo en la expresión del gen con respecto a los niveles basales, cuando los organismos entran al periodo de metamorfosis; posteriormente, la expresión se da de manera fluctuante durante el crecimiento, es decir, existen momentos de rápido y lento crecimiento muscular durante el desarrollo del pargo, lo cual podría también estar relacionado con las técnicas de cultivo, ya que las altas expresiones podrían coincidir con los tiempos donde los juveniles requieren de una separación de talla y la baja expresión de miostatina coincide con el rápido crecimiento que experimentan los juveniles después de una separación de tallas.

Si bien son pocos los estudios que describen la expresión de miostatina durante el desarrollo en peces, es importante notar que si los parálogos del gen influyen de manera diferente en el desarrollo del pez, es de esperar que los patrones de expresión sean distintos en peces con diferentes mecanismos de crecimiento muscular (De Santis *et al.*, 2012).

Así mismo, se ha especulado que en teleósteos la miostatina-1 aparentemente inhibe la hiperplasia en el músculo, pero probablemente no la hipertrofia, así el crecimiento por hipertrofia quizás solo se alcance cuando la miostatina-2 sea bloqueada (De Santis *et al.*, 2012). Roberts & Goetz (2003) reportaron la existencia de distintos sitios de unión en las regiones promotoras de la miostatina-1 (NFkB, GRE, ARE) y miostatina-2 (SF-1), por lo que probablemente podría ser una manera de regular diferencialmente la expresión de ambas isoformas y, por lo tanto, participar en distintos procesos.

4.3 Objetivo 3. Evaluar el patrón de expresión en el músculo y relacionarlo con el crecimiento en peso y talla del pez.

Durante el desarrollo juvenil, se observa que las primeras semanas se presenta un crecimiento lento, tanto en peso como en longitud, donde las desviaciones estándar son más pequeñas, a los 70dpe es de notar que existe mayor crecimiento entre las semanas restantes al estudio, al igual que las desviaciones estándar aumentan considerablemente (tabla 6).

Tabla 6. Media y desviación estándar de peso y talla desarrollo juvenil

DPE	Peso (g)	DE	Longitud (mm)	DE
49	1.31	0.78	1.31	0.78
56	2.62	0.96	55.83	6.73
63	3.02	1.55	58.38	9.70
70	5.81	2.39	72.82	10.26
77	7.62	3.59	77.83	12.33
84	11.28	5.10	87.22	12.99
91	14.26	7.56	95.22	19.58

Se realizaron dos Análisis de Varianza de una vía Kruskal-Wallis, uno para peso y otro para talla, donde se evaluó la existencia del efecto del día en el peso y talla, encontrando efecto significativo ($p < 0.05$). Solo se presentarán los análisis de peso (Figura 23 y Anexo 2-2.1), por ser el factor relevante en este estudio, sin embargo los estadísticos para talla pueden observarse en el Anexo 2-2.2 y 2.3.

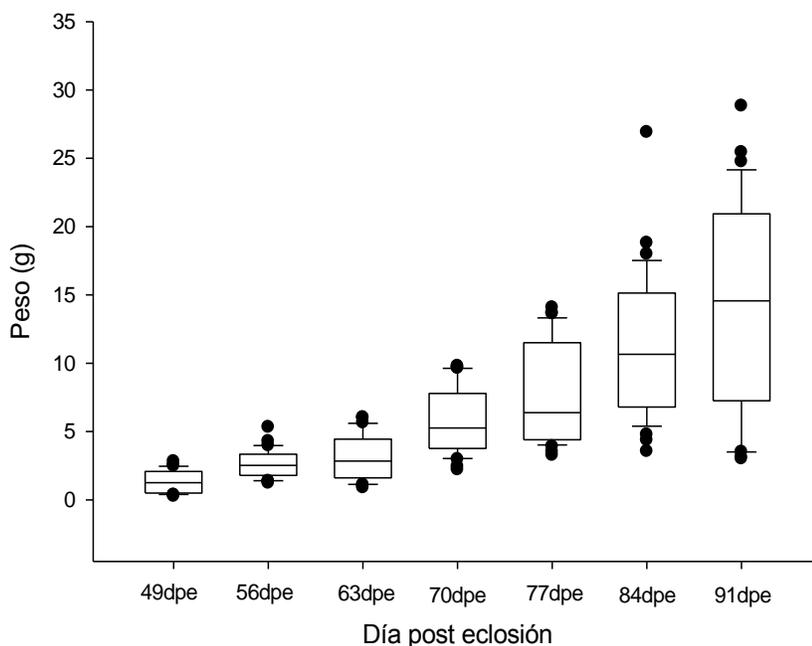


Figura 23. Crecimiento en peso durante el desarrollo juvenil. Las fechas indican diferencias significativas en los niveles de expresión con respecto al nivel basal (14hpf y 0dpe). Los extremos de cada caja representan del 25% al 75% de los datos, la línea en el centro de la caja representa la mediana, las líneas que se extienden de las cajas simbolizan los valores máximos y los puntos valores atípicos.

Los resultados del análisis de varianza Kruskal-Wallis indican que no existe diferencia significativa en el crecimiento en peso del pargo entre los días 49 vs 56 y 56 vs 63, lo cual coincide con los incrementos en la expresión de miostatina en los días 56 y 63 reportados en el objetivo 2 (Figura 22). De igual manera no existe diferencia significativa en peso entre los días 70 vs 77 y 77 vs 84, coincidiendo de nuevo con los niveles de expresión elevados para el día 77. Estos resultados nos llevan a suponer que la miostatina podría jugar un papel importante en las etapas de rápido y lento crecimiento para *L. guttatus*.

Antes de analizar la existencia de relación entre la expresión de miostatina y el peso del pez se presenta una correlación mediante el factor de correlación de Spearman entre el peso y talla del pez, con el fin de describir y conocer la naturaleza de los datos, resultando estadísticamente significativa ($r=0.997$, $p<0.001$, $n=252$) (Figura 24).

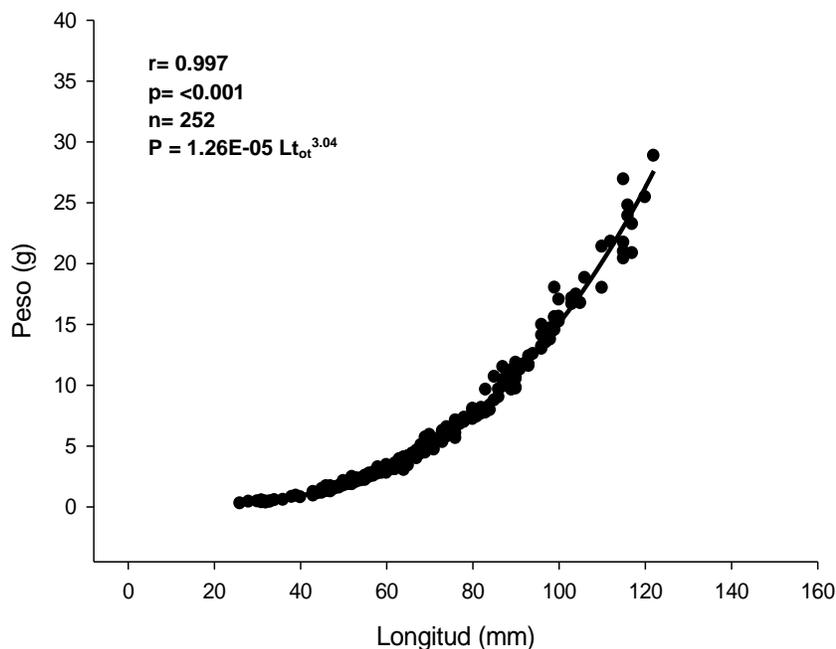


Figura 24. Correlación peso-talla en juveniles (49 a 91 dpe).

La ecuación que describe la relación peso-longitud es $P = 1.26E-05 L_{tot}^{3.04}$, por lo tanto se observa que el tipo de crecimiento que presenta *L. guttatus* es isométrico, ya que el valor del coeficiente de alometría (b) no es diferente significativamente de 3 ($b = 3.04$, $p > 0.05$, Figura 24).

La correlación peso-miostatina fue baja aunque significativa ($r=-0.195$, $p=0.03$, $n=124$), observándose que organismos más pequeños presentan mayores niveles de expresión de miostatina. Carlson y colaboradores en 1999, presentaron la falta de una correlación significativa entre la atrofia del músculo de ratón inducida por la sobreexpresión de miostatina. Esta ausencia de correlación significativa de la miostatina con factores que pudieran sobre-regular la miostatina

ya ha sido reportada. Por ejemplo, no se encontró relación entre de los niveles ARNm de miostatina y la disminución del crecimiento muscular inducido por el desove, o por condiciones como el hacinamiento o ayuno prolongado (Rescan 2005; Rescan *et al.*, 2001; Vianello *et al.*, 2003; Rodgers *et al.*, 2003).

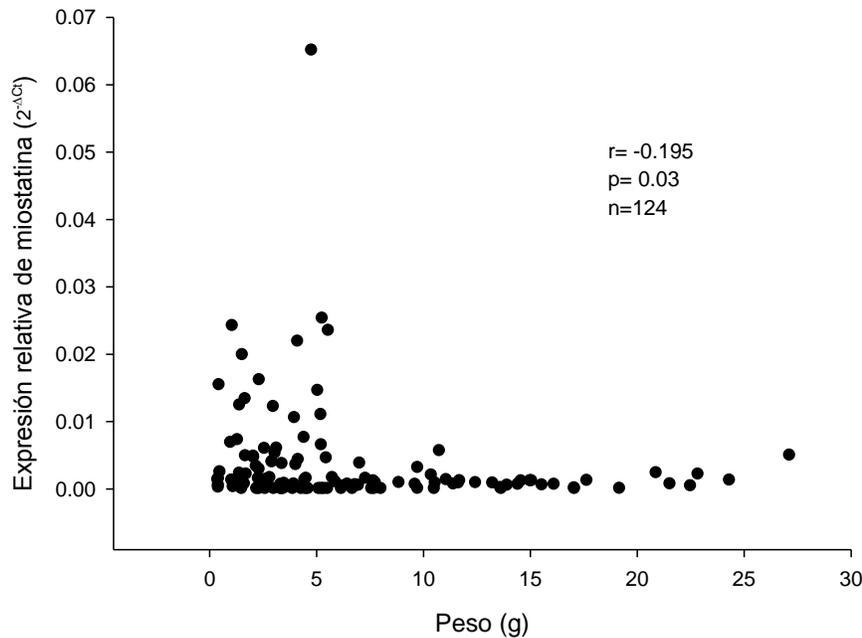


Figura 25. Correlación entre la expresión de miostatina y el peso durante la etapa juvenil (49-91dpe).

Estos resultados de correlación no significativa en organismos sin mutaciones en el gen de la miostatina, pueden deberse a que la miostatina no es el único factor que interviene en el crecimiento, se especularía la existencia de otros factores que regulan el crecimiento, por ejemplo, ya se ha reportado la presencia de factores de transcripción que se unen a la región promotora de la miostatina, considerados como factores específicos de células que producen hormona de crecimiento, observando el sitio GH-CSE en la región promotora de miostatina de *Salvelinus fontinalis* y *Ictalurus punctatus*, apoyando el supuesto de la relación entre la expresión de la miostatina y la hormona de crecimiento y que esta relación podría estar regulada a nivel génico (Roberts & Goetz, 2003).

Los niveles del transcrito disminuyen por la presencia de la proteína, ya sea LAP y/o el péptido activo, como ocurre con otros reguladores de crecimiento como la hormona de crecimiento; es importante notar que la expresión del transcrito es fluctuante durante el crecimiento de *L. guttatus*, lo que presume etapas de rápido y lento crecimiento, como ocurre en otros organismos vivos, pudiendo ser también un factor que contribuye a no encontrar correlación significativa.

Se puede observar que los organismos que crecieron menos en peso, corresponden a la mayoría en este estudio (65%) y presentan niveles de expresión de miostatina mayores a los organismos que crecieron más en peso. Para probar este supuesto, se formaron dos grupos de peso con respecto a la media de todos los organismos durante el experimento (6.6g). El grupo 1 correspondiente a los organismos con pesos menores a la media y el grupo 2 correspondiente a organismos con pesos mayores a la media, con el fin de determinar diferencias en la expresión de miostatina mediante un ANOVA de una vía, encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) (Tabla 7 y Figura 26)

Tabla 7. ANOVA 1 vía grupos de peso 1 y 2 con respecto a la media

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	1	0.0165	0.0165	9.66	<0.05
Residual	122	0.209	0.00171		
Total	123	0.225			

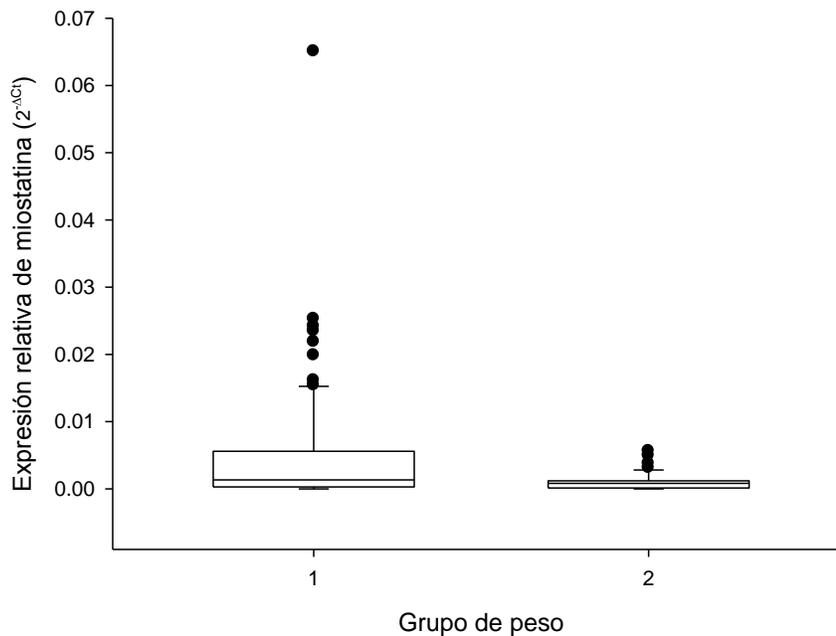


Figura 26. Expresión miostatina en dos grupos de peso con relación a la media (6.6g). Los extremos de cada caja representan del 25% al 75% de los datos, la línea en el centro de la caja representa la mediana, las líneas que se extienden de las cajas simbolizan los valores máximos y los puntos valores atípicos.

Una vez determinada la existencia de diferencias significativas en la expresión de miostatina entre organismos que tienen pesos menores a la media con respecto a los que poseen pesos mayores a la media, se realizaron subgrupos de peso con el fin de observar cuales son los pesos que agrupan los mayores niveles de expresión. Se separaron tres grupos de peso menores a la media y tres grupos mayores a la media. El primer grupo comprende los pesos 0.3 – 2.02g, el segundo grupo de 2.03 – 4.18g, el tercer grupo 4.19 – 6.6g (menores a la media), cuarto grupo de 6.6 – 13.63g, quinto grupo de 13.64 – 20g y el sexto grupos los organismos mayores a 20g. Se aplicó un análisis de varianza de una vía, encontrando diferencias significativas (Tabla 8). La prueba de comparaciones pareadas Fisher (Anexo 2-2.4) nos muestra que los grupos 1 y 3 son estadísticamente diferentes a los grupos 4 y 5 (Figura 27). Lo que indica que los organismos con pesos bajos tienen niveles mayores de expresión de miostatina. Una vez que los organismos alcanzan aproximadamente 6.6g, en este caso tomando como referencia la media, la expresión de miostatina disminuye, por lo

que crecerán más rápido en peso. Estos datos resultan interesantes ya que consultando la tabla 8, este peso (6.6g) se alcanza entre el 70 y 77 dpe, en etapas ya avanzadas del desarrollo juvenil; así, anterior al 70 dpe el crecimiento fue más lento. Se puede notar que los peces crecen lento hasta antes de los 7g; una vez alcanzados los 7g, el crecimiento en peso es más rápido hasta que alcanzan los 20g y la expresión de miostatina aumenta de nuevo.

Tabla 8. ANOVA 1 vía 6 grupos de peso

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	5	0.0208	0.00415	2.395	< 0.05
Residual	118	0.205	0.00173		
Total	123	0.225			

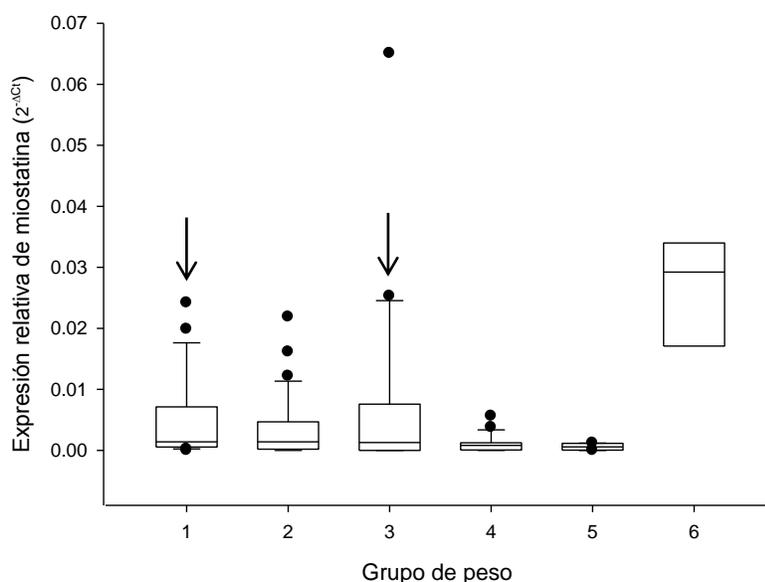


Figura 27. Expresión miostatina en seis grupos de peso referentes a las media. 1, 2 y 3 menores a la media y 4, 5, y 6 mayores a la media en peso. Las fechas indican diferencias significativas en los niveles de expresión con respecto al nivel basal (14hpf y 0dpe). Los extremos de cada caja representan del 25% al 75% de los datos, la línea en el centro de la caja representa la mediana, las líneas que se extienden de las cajas simbolizan los valores máximos y los puntos valores atípicos.

Aplicando una ANOVA de dos vías, utilizando como factores los grupos de peso (seis grupos de peso con referencia a la media) y la edad, para evaluar la existencia de diferencias significativas con respecto a la expresión relativa de miostatina (Tabla 9), se encontró diferencia significativa en el factor edad, el cual

coincide con lo ya mencionado en el objetivo 2, para la expresión de miostatina, (comparaciones pareadas se encuentran en el Anexo 2-2.5).

Los grupos de peso no arrojaron un valor significativo, sin embargo, si explican alrededor el 70% de la varianza, por lo tanto al realizar comparaciones pareadas con el método de Fisher, se demuestra la existencia de diferencias significativas en los grupos de peso 1 y 3 con respecto a los grupos 4 y 5 (Tabla 10), es decir, los organismos con pesos menores de la media presentan mayores niveles de expresión de miostatina que los organismos que poseen pesos mayores a los de la media.

Tabla 9. ANOVA 2 vías grupos de peso y edad

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
EDAD	6	0.0413	0.00688	4.717	<0.05
Gpo de PESO	5	0.0104	0.00209	1.432	0.218
Residual	112	0.163	0.00146		
Total	123	0.225	0.00183		

Tabla 10. Comparaciones pareadas con el método Fisher (LSD) para grupos de peso

Grupo de peso	1	2	3	4	5	6
1		0.255379	0.970774	0.007587	0.009884	0.384768
2	0.255379		0.278381	0.075732	0.066097	0.833194
3	0.970774	0.278381		0.009151	0.011304	0.399678
4	0.007587	0.075732	0.009151		0.668299	0.406464
5	0.009884	0.066097	0.011304	0.668299		0.291708
6	0.384768	0.833194	0.399678	0.406464	0.291708	

4.4 Objetivo 4. Cuantificar la expresión de la miostatina en diferentes tejidos.

La expresión del transcrito de miostatina fue detectado en los diez órganos previamente mencionados por PCR punto final, aunque el análisis es cualitativo, permite notar diferencias en el nivel de expresión de miostatina, lo cual fue confirmado mediante PCR tiempo real.

En la cuantificación de miostatina, primero se obtuvo el análisis de estabilidad de los genes constitutivos (18S ribosomal y β -actina), para la normalización de la expresión génica de todos los órganos. Aunque cada órgano presentó mayor estabilidad en uno u otro gen (Tabla 11), para fines comparativos y tener mayor estandarización en la comparación se utilizó β -actina para el cálculo de la expresión relativa de miostatina.

Tabla 11. Análisis de estabilidad de genes de referencia para tejidos de *L. guttatus* de 194 dpe

Tejido	Método				
	Comprehensive	Delta CT	BestKeeper	normFinder	Genorm
Corazón	β -actina	β -actina / 18S	18S	β -actina / 18S	18S / β -actina
Ojo	β -actina	β -actina / 18S	18S / β -actina	β -actina / 18S	18S / β -actina
Cerebro	β -actina	β -actina / 18S	β -actina / 18S	β -actina / 18S	18S / β -actina
Estómago	β -actina	β -actina / 18S	18S / β -actina	β -actina / 18S	18S / β -actina
Riñón	β -actina	β -actina / 18S	18S	β -actina / 18S	18S / β -actina
Vejiga natatoria	β -actina	β -actina / 18S	β -actina	β -actina / 18S	18S / β -actina
Branquia	β -actina	β -actina / 18S	18S	β -actina / 18S	18S / β -actina
Hígado	β -actina	β -actina / 18S	18S	β -actina / 18S	18S / β -actina
Intestino	β -actina	β -actina / 18S	18S	β -actina / 18S	18S / β -actina
Músculo	β -actina	β -actina / 18S	β -actina / 18S	β -actina / 18S	18S / β -actina

Una vez obtenidos los datos de expresión génica, se aplicó la transformación de raíz cuadrada y posteriormente se realizó el análisis de varianza de una vía entre los diferentes órganos, mostrando que la expresión del gen de miostatina a los 194 dpe muestra diferencias significativas entre órganos ($p < 0.05$, Tabla 12). Las comparaciones pareadas por el método de Fisher indican que el tejido muscular, cerebro, ojo y branquia no son significativamente diferentes entre sí, pero presentan diferencia significativa en la expresión de miostatina con

respecto a intestino, hígado, estómago, riñón, vejiga natatoria y corazón, y estos últimos órganos no son diferentes entre sí (Figura 28 y Anexo 2-3.1). Esto sugiere que hay órganos y tejidos en los que la miostatina ejerce funciones adicionales a las musculares.

Tabla 12. ANOVA 1 vía entre órganos de 194 dpe

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	9	0.0796	0.00884	8.768	<0.05
Residual	69	0.0696	0.00101		
Total	78	0.149			

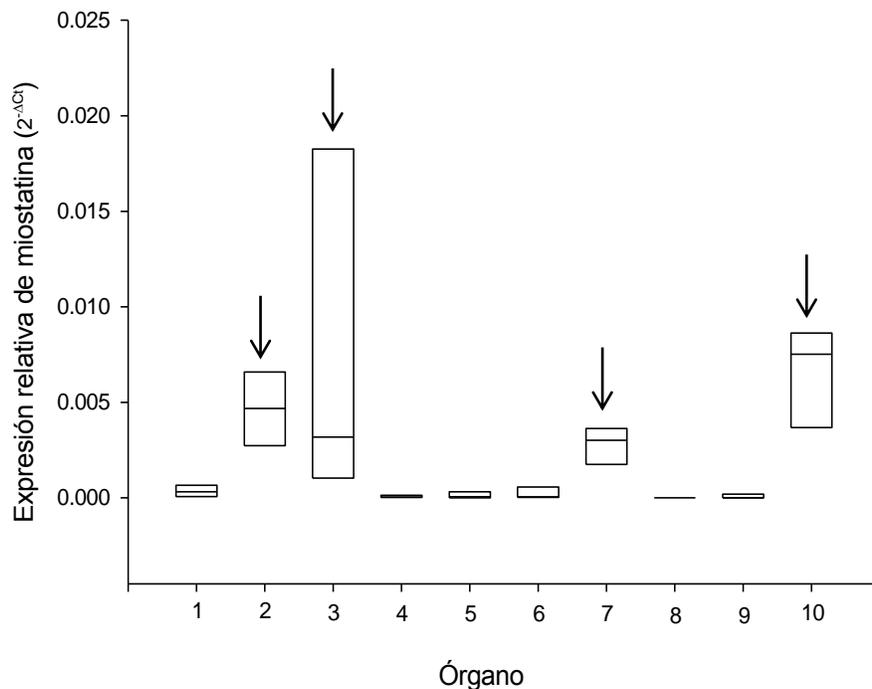


Figura 28. Expresión miostatina en órganos de *L. guttatus* a los 194dpe. 1=corazón, 2=Ojo, 3=cerebro, 4=Estómago, 5=riñón, 6= vejiga natatoria, 7=branquia, 8=hígado, 9=intestino y 10=músculo. Las fechas indican diferencias significativas en los niveles de expresión. Los extremos de cada caja representan del 25% al 75% de los datos, la línea en el centro de la caja representa la mediana.

En *Danio rerio*, el análisis de expresión de miostatina 1 presentó mayor expresión en cerebro, músculo, corazón, ojo, testículos y bazo (Helterline *et al.*, 2007), coincidiendo con pargo flamenco en los altos niveles de expresión en cerebro, músculo y ojo. En tilapia los autores detectan expresión en ojo, fibras braquiales, ovarios, cerebro, pero no en hígado, riñón, estómago y corazón, similar a lo que se encontró en pargo flamenco (Rodgers *et al.*, 2001). En *Lateolabrax japonicus*, reportan alta expresión en músculo, cerebro y ojo, un poco menos en intestino y una débil expresión en branquia, hígado, bazo y corazón (Ye *et al.*, 2007), estos patrones de expresión distintos en órganos parece ser común en teleósteos (Rescan *et al.*, 2001; Maccatrozzo *et al.*, 2001; Robert & Goetz 2001; Kocabas *et al.*; 2002; Ye *et al.*, 2007).

Probablemente las diferencias se deben a la edad de los organismos, ya que la miostatina podría mostrar fluctuaciones en su expresión en tejidos, como ocurre en el músculo, lo cual no ha sido reportado.

Debido a que el cerebro es un órgano no muscular con alta expresión de miostatina, se decidió aislar y caracterizar el o los transcritos en ese tejido por medio de RACE. Los resultados indican que el cerebro expresa la misma miostatina 1 que el músculo además de una variante de splicing, la cual presenta una delección de 75 nucleótidos en el exón 1, del nucleótido 104 al 178 (Figura 29), ambas variantes están siendo co-amplificadas en el análisis de qPCR, ya que son iguales en la región 3' y esta región, es donde se localizan los oligos para qPCR (Figura 29). Esta miostatina aislada de cerebro se le nombra *L. guttatus* miostatina-1b, la cual presenta las mismas zonas de intrones y exones que la miostatina 1 de músculo (miostatina-1a), así como la caracterización ya descrita en el objetivo 1, la zona de procesamiento proteolítico y las 9 cisteínas conservadas en el péptido activo (Figura 30).



Figura 29. Alineación de miostatina aislada de músculo (*L. guttatus-mstn-1mus*), miostatinas aisladas de cerebro (*L. guttatus-mstn1a-ce* y *L. guttatus-mstn1b-ce*) y *L. russellii*. En el recuadro de línea continua muestra la delección de 75nt en el transcrito de miostatina-1b de cerebro. El recuadro con línea discontinua muestra las zonas donde se localizan los oligos utilizados en el análisis por qPCR.

1 AUGCAUCUGUCUCAGAUUGUGCUGUAUGUUAGCCUGCUCAUUGCUUUGGGUCCAGUAGUU 60
 M H L S Q I V L Y V S L L I A L G P V V

61 CUGAGUGACCAAGAGACGCACCAGCAGCAGCCUCCGCCAUCAAGUCUCAGAUUCUG 120
 L S D Q E T H Q Q Q P S A I K S Q I L

121 AGCAAACUGCGGAUGAAAGAAGCUCCAAACAUCAGCCGAGACAUCGUGAAGCAGCUCCUG 180
 S K L R M K E A P N I S R D I V K Q L L

181 CCCAAAGCGCCGCCUGCAGCAGCUUCUCGACCAGUACGACGUGCUGGGAGAUGAUAAAC 240
 P K A P P L Q Q L L D Q Y D V L G D D N

241 AGGGAUGUGGUCAUGGAGGAGGACGAUGAGCAUGCCAUCACGGAGACGAUAAUGAUGAUG 300
 R D V V M E E D D E H A I T E T I M M M

301 GCCACUGAACCCGAGGCCAUCGUCCAGGUGGAUGGGGAACCAAGGUGCUGUUUUUCUCU 360
 A T E P E A I V Q V D G E P R C C F F S

361 UUUACUCAAAAAGUUUCAAGCCAUCGCAUAGUCCGAGCGCAGCUCUGGGUGCAUCUGCGC 420
 F T Q K F Q A N R I V R A Q L W V H L R

421 GCGGCGGAGGAGGCGACCACGGUGUUCUGCAGAUUCGCCUGAUGCCGGUCACAGAC 480
 A A E E A T T V F L Q I S R L M P V T D

481 GGAACAGGCACAUAACGCAUCCGCUCCUGAAGAUCGACGUGAACGCCGGGGUCAGCUCU 540
 G N R H I R I R S L K I D V N A G V S S

541 UGGCAAAGUAUAGACGCUAAACAAGUGUUGAGCGUGUGGCUGCGGCAGCCGGAGACCAAC 600
 W Q S I D V K Q V L S V W L R Q P E T N

601 UGGGGCAUCGAGAUUAACCCUUCGAUUCGAGGGGAAACGACUUGGCCGUGACCUCCGCA 660
 W G I E I N A F D S R G N D L A V T S A

661 GAGCCCGGAGAGGAAGGGCUGCAACCGUUAUGGAGGUGAAGAUCUCAGAGGGCCCAAG 720
 E P G E E G L Q P F M E V K I S E G P K

721 CGUGCAAGGAGAGACUCAGGUCUGGACUGUGACGAGAUCUCUCCAGAGUCCCGUUGCUGC 780
R A R R D S G L D **C** D E N S P E S R **C C**

781 CGUUAACCCGUCACAGUGGACUUUGAAGACUUUGGCUGGGACUGGAUUAUUGCCCAAG 840
 R Y P L T V D F E D F G W D W I I A P K

841 CGCUACAAGGCCAACUAUUGCUCCGGGAGUGAGUACAUGCACUUGCAAAAGUACCCA 900
 R Y K A N Y **C** S G E **C** E Y M H L Q K Y P

901 CACACCCACCUUGGUGAACAAAGCCAACCCAGAGGGACCGUGCCCCUGCUGUACCCCC 960
 H T H L V N K A N P R G T A G P **C C** T P

961 ACCAAGAUGUCGCCCAUCAACAUGCUCUACUUUAACCGAAAAGAGCAGAUCAUCUAUGGC 1020
 T K M S P I N M L Y F N R K E Q I I Y G

1021 AGAUCCCUUCCAUGGUAGUAGACCGCUGGGUGCUAA 1059
 K I P S M V V D R **C G C** *

Figura 30. Región codificante de miostatina para *L. guttatus* miostatina-1b de 1059 pb y su traducción de 352 aminoácidos. En gris se indica la región de procesamiento proteolítico y las 9 cisteínas conservadas en el péptido activo.

La miostatina-1b de *L. guttatus* posee un porcentaje de similitud del 93% con la miostatina-1a, un 92% con la secuencia de aminoácido de *L. russellii* y un 86% con *Oreochromis mossambica*, por mencionar algunos.

En otras especies se han reportado variantes, tanto de la miostatina-1 como de la miostatina-2, como es el caso de los salmónidos, por ejemplo en *Oncorhynchus mykiss*, se reportó primeramente, el aislamiento de la miostatina 1a y 1b, donde el número de nucleótidos en los 3 exónes de los 2 genes es igual, difieren en las UTR's (5' y 3') y en algunos de los factores de transcripción que se unen a las regiones promotoras de ambos genes (Garikipati *et al.*, 2006), las diferencias encontradas en las regiones codificantes de las miostatina-1a y -1b en *O. mykiss*, no son similares a las que reportamos para *L.guttatus*, sin embargo, la miostatina-2b de *O. mykiss*, presenta una delección de 51pb en el segundo exón, que corresponden a 17 aminoácidos, con relación a la miostatina-2a de *O.mykiss*, no obstante, aún se desconoce si las variantes, llamadas pseudogenes son funcionalmente activas o similarmente expresada (Garikipati *et al.*, 2007).

Este es el primer reporte de una variante de miostatina-1 en una especie distinta a la familia de los salmónidos, pero se requieren más investigaciones para indagar en las funciones que participan ambos transcritos, por lo tanto, será necesario diseñar oligos flanqueando la delección para intentar hacer análisis más detallados de la expresión de ambas variantes. De igual manera se requiere aislar los transcritos de miostatina en ojo y branquia ya que la expresión en estos tejidos es también alta.

Finalmente, los datos obtenidos en conjunto en este trabajo, permiten apoyar la hipótesis planteada, ya que la expresión de miostatina fue baja durante el desarrollo larvario, incrementando durante el desarrollo juvenil, mostrando niveles más altos en los organismos que presentaron menor tasa de crecimiento. Además, la miostatina presenta funciones adicionales a las del crecimiento muscular, ya que su expresión fue demostrada en tejidos no musculares.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

- La región codificante del transcrito de la miostatina en músculo del pargo flamenco fue aislada y caracterizada, está compuesta por 1134 nucleótidos traduciendo un péptido de 377 aminoácidos.
- El análisis filogenético indica que el transcrito de miostatina aislado del músculo del pargo flamenco corresponde a la isoforma 1.
- La miostatina se expresa en niveles muy bajos durante el desarrollo embrionario y larvario del pargo flamenco, incrementando significativamente el día 28 después de la eclosión, cuando ocurre la metamorfosis; a partir de entonces la expresión se presenta de manera fluctuante.
- Los peces de menor peso (independientemente de la edad) presentan mayores niveles de expresión de miostatina, indicando que este participa en la regulación negativa del crecimiento muscular.
- La miostatina se encuentra expresada en tejidos no musculares como cerebro, ojo y branquia, por lo que se asume que lleva a cabo funciones no musculares que deberán ser identificadas en futuros estudios.
- El cerebro expresa una variante de splicing de la miostatina 1, la cual presenta una delección en el exón 1, posee 1059 nucleótidos, con una proteína de 352 aminoácidos y cuyo nivel de expresión deberá medirse en futuros estudios.

CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda llevar a cabo el bloqueo postranscripcional durante el desarrollo embrionario, para evaluar diferencias fenotípicas y efectos a largo plazo en los organismos.
- Asimismo se recomienda realizar el bloqueo postranscripcional de miostatina antes del 28 dpe y evaluar la duración del bloqueo.
- Se recomienda buscar, aislar y caracterizar el transcrito de miostatina también en ovario y medir su expresión durante el desarrollo gonádico de *L. guttatus*.
- Es recomendable realizar la técnica de hibridación in situ en cerebro para conocer la localización celular del transcrito de miostatina.
- Se sugiere analizar otros genes de referencia para la normalización de la expresión génica, ya que 18S ribosomal no mostró eficiencia adecuada, y es recomendable contar con más genes de referencia.
- Se recomienda el análisis de la expresión del gen de miostatina en bazo, ya que se ha sugerido que la miostatina podría influir en el desarrollo de las células del sistema inmune en peces.

REFERENCIAS

- Álvarez-Lajonchère, L., Abdo de la Parra, M. I., Rodríguez-Ibarra, L. E., Velasco-Blanco, G., Puello-Cruz, A. C., González-Rodríguez, B., Ibarra-Soto, A., & Ibarra-Castro, L. (2012). The Scale-up of Spotted Rose Snapper, *Lutjanus guttatus*, Larval Rearing at Mazatlan, Mexico. *JOURNAL OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY*, Vol. 43, No. 3.
- Amali, A. A., Lin, C. J., Chen, Y. H., Wang, W. L., Gong, H. Y., Lee, C.Y., Ko, Y. L., Lu, J. K., Her, G. M., Chen, T. T. & Wu, J. L. (2004). Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1. *Dev Dyn*; 229(4): 847-56.
- Amthor, H., Otto A, Macharia R, McKinnell I, Patel K. (2006). Myostatin imposes reversible quiescence on embryonic muscle precursors. *Dev Dyn*; 235(3): 672-80.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Ørntoft, T.F. (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.
- Andrade-Tinoco, E. & Espino-Barr, E. (2006). Características de la pesquería del camarón en la Laguna de Cuyutlán. Colima, México (1994-1997). pp.: 425-436. En: M.C. Jiménez-Quiroz y Espino-Barr, E. (eds). Los recursos pesqueros y acuícolas de Jalisco, Colima y Michoacán. INP, SAGARPA, México. 622P.
- Argilés, J.M., Orpí, M., Busquets, S., & López-Soriano, F. (2012). Myostatin: more than just a regulator of muscle mass. *Drug Discovery Today*, 17 (13/14): 702-79.

- Bass, J., Oldham, J., Sharma, M., & Kambadur, R. (1999). Growth factors controlling muscle development. *Domestic Animal Endocrinology*, 17: (191–197).
- Bustin, S.A. (2010). Why the need for qPCR publication guidelines?—The case for MIQE. *Methods*, 50: 217-226.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55: 611-622.
- Carlson, C.J., Booth, F.W., Gordon, S.E. (1999). Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol*, 277(2 Pt 2):R601-6.
- Cediel, J.F., Cárdenas, M.H., García, A., Chuaurie, L., Payán, C., Villegas, V., Sánchez, C. (2009). *Manual de Histología Tejidos fundamentales*. Editorial Universidad del Rosario. Primera Edición, pp. 93-97.
- Clop, A., Marcq, F., Takeda, H., Pirottin, D., Tordoir, X., Bibé, B., Bouix, J., Caiment, F., Elsen, J. M., Eychenne, F., Laezul, C., Laville, E., Meish, F., Milenkovic, D., Tobin, J., Charlier, C., Georges, M. (2006). A Mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene effects muscularity in sheep. *Nat Genet*, 38: 813-818.
- Currie, P.D. & Ingham, P.W. (2001). Induction and patterning of embryonic skeletal muscle cells in the zebrafish. *Fish Physiology*, Volume 18, Muscle Development and Growth: 1–4, IN1–IN2, 5–17.
- De Santis, C., Gomes, G.B., Jerry, D.R. (2012). Abundance of myostatin gene transcripts and their correlation with muscle hypertrophy during the development of barramundi, *Lates calcarifer*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 163(B) :101-107.

- Funkenstein, B., Balas, V., Rebhan, Y. & Pliatner, A. (2009). Characterization and functional analysis of the 5' flanking region of *Sparus aurata* myostatin-1 gene. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*, 153: 55-62.
- Galaviz, M. A., García-Ortega, A., Gisbert, E., López, L. M., García-Gasca, A. (2012). Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 161, 9-16
- Garikipati, D. K., Gahr, S. A., Roalson, E. H. & Rodgers, B. D. (2007). Characterization of Rainbow Trout Myostatin-2 Genes (rtMSTN-2a and -2b): Genomic Organization, Differential Expression, and Pseudogenization. *Endocrinology*, 148(5):2106–2115.
- Garikipati, D. K., Gahr, S. A., Rodgers, B. D. (2006). Identification, characterization, and quantitative expression analysis of rainbow trout myostatin-1a and myostatin-1b genes. *J Endocrinol*, 190(3):879-88.
- González-Cadavid, N. F., Taylor, W. E., Yarasheski, K., Sinha-Hikim, I., Ma, K., Ezzat, S., She, R., Lalani, R., Asa, S., Mamita, M., Nair, G. & Arver, S. (1998). Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad*, 95(25): 1498-1443.
- Grobet, L., Martin, L. J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Menissier, F., Massabanda, J., Fries, R., Hanset, R., Georges, M. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nat Genet*, 17: 71-74.
- Helterline, D., Garikipati, D., Stenkamp, D., Rodgers, B. (2007). Embryonic and tissue-specific regulation of myostatin-1 and -2 gene expression in zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 151: 90-97.

- Ji, S., Losinski, R. L., Cornelius, S. G., Frank, G.R., Willis, G. M., Gerrard, D.E., Depreux, F.F. & Spurlock, M.E. (1998). Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *Am J Physiol*, 275(4 Pt 2):R1265-73.
- Jin, H.J., Dunn, M.A., Borthakur, D., Kim, Y.S. (2004). Refolding and purification of unprocessed porcine myostatin expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 35(1):1-10.
- Kocabas, A. M., Kucuktas, H., Dunham, R. A. & Liu, Z. (2002). Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biochim Biophys Acta*, 1575(1-3):99-107.
- Koumans, J.T.M. & Akster, H.A. (1995). Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp Biochem Physiol*, 110A: 3-20.
- Kouzarides, T. (1999). Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9(1): 40-48.
- Lee, S. J. & McPherron, A. C. (2001). Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci*, 98(16): 9306-11.
- Lee, S. J., (2007). Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF- β signaling pathways. *PLoS ONE*, 2: e789.
- Lee, S.J. (2010). Extracellular regulation of Myostatin: A molecular rheostat for muscle mass. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem*, 10: 183-194.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25: 402-408.
- Llera-Herrera, R., García-Gasca, A., Huvet, A. & Ibarra, A.M. (2012). Identification of a tubulin- α gene specifically expressed in testis and adductor muscle during stable reference gene selection in the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Marine Genomics*, 6: 33-44.

- Lodish, Harvey, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky y Darnell. (2006). *Biología celular y molecular*. Editorial Médica Panamericana. Quinta edición, pp. 913-917.
- Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Radaelli, G., Mascarello, F., Patarnello, T. (2001). Characterization of the Myostatin Gene in the Gilthead Seabream (*Sparus aurata*): Sequence, Genomic Structure, and Expression Pattern. *Mar. Biotechnol*, 3: 224–230.
- Matzuk, M.M., Lu, N., Vogel, H., Sellheyer, K., Roop, D.R., Bradley, A. (1995). Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature*, 374: 360-363.
- McCroskery, S., Thomas, M., Maxwell, L., Sharma, M. & Kambadur, R. (2003). Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol*, 162 (6):1135-47.
- McPherron, C.A., Lawler, M.A., Lee, S.J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*, 387: 83-90.
- Meuwissen, T. H. & Goddard, M. E. (2003). Bootstrapping of gene-expression data improves and controls the false discovery rate of differentially expressed genes. *Genet Sel Evol*, 36, 191-205
- Ming, J., Qiang, Z., Jianwei, Y., Xueyan, W., Wei, Y. & Dahai, Z. (2008). Myostatin induces p300 degradation to silence cyclin D1 expression through the P13K/PTEN/Akt pathway. *Cellular Signalling*, 20:1452-1458.
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R. & Schäffer, A. A. (2008). Database Indexing for Production Mega BLAST Searches. *Bioinformatics*, 24:1757-1764.
- Mosher, D. S., Quignon, P., Bustamante, C. D., Sutter, N. B., Mellersh, C. S., Parker, H. G., Ostrander, E. A. (2007). A Mutation in the myostatin gene

- increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet*, 3: e79.
- Ostbye, T.K., Galloway, T.F., Nielsen, C., Gabestad, I., Bardal, T., Andersen, O. (2001). The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *Eur. J. Biochem*, 268: 5249-5257.
- Pauly, D. (1983). Some methods for the assessment of tropical fish stocks. Fish. Tech. Paper 234. FAO, Roma. 52p.
- Perry, R.L.S. & Rudnick, M.A. (2000). Molecular Mechanisms Regulating Myogenic Determination and Differentiation. *Frontiers in Bioscience*, 5: 750-767.
- Rebbapragada, A., Benchabane, H., Wrana, J.L., Celeste, A.J., Attisano, L. (2003). Myostatin Signals a Transforming Growth Factor β -Like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, 20): 7230-7242.
- Rescan, P. Y. (2005). Muscle growth patterns and regulation during fish ontogeny. *Gen Comp Endocrinol*, 142 (1-2):111-6.
- Rescan, P. Y., Jutel, I. & Rallièrè, C. (2001). Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol*, 204: 3523-3529.
- Roberts, S. B. & Goetz, F. W. (2003). Myostatin protein and RNA transcript levels in adult and developing brook trout. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 210: 9–20
- Roberts, S. B., Goetz, F. W. (2001). Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. *FEBS let*, 491: 212-216.
- Rodgers, B. D. & Garikipati, D. K. (2008). Clinical, Agricultural, and Evolutionary Biology of Myostatin: A Comparative Review. *Endocrine Reviews*, 29 (5): 513-534.

- Rodgers, B. D., Roalson, E. H., Weber, G. M., Roberts, S. B. & Goetz, F. W. (2007). A proposed nomenclature consensus for the myostatin gene family. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292: E371–E372
- Rodgers, B. D., Weber, G. M., Kelley, K.M. & Levine M. A. (2003) Prolonged fasting and cortisol reduce myostatin mRNA levels in tilapia larvae; short-term fasting elevates. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 284(5):R1277-86.
- Rodgers, B. D., Weber, G. M., Sullivan, C. V. & Levine, M. A. (2001). Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology*, 142(4):1412-8.
- Rodino-Klapac, L.R., Haidet, A.M., Kaspar, B.K., Kota, J., Mendell J.R. (2009). Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. *Muscle & Nerve*, 39 (3): 283-296.
- Rowlerson, A. & Veggetti, A. (2001). Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. *Fish Physiology, Volume 18, Muscle Development and Growth*: 103–140.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- Saunders, M.A., Good, J.M., Lawrence, E.C., Ferrell, R.E., Li, W.H. & Nachman, M.W. (2006). Human adaptive evolution at Myostatin (GDF8), a regulator of muscle growth. *Am J Hum Genet*, 79(6):1089-97.
- Sawatari, E., Seki, R., Adachi, T., Hashimoto, H., Uji, S., Nakata, T., Kinoshita, M. (2010). Overexpression of the dominant-negative form of myostatin results in doubling of muscle-fiber number in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 155(2):183-189.

- Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L. E., Hübner C., Riebel, T., Kömen, W., Braun, T., Tobin, J. F., & Lee S. J. (2004). Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med*; 350:2682-2688.
- Sharma, M., Kambadur, R., Matthews, K.G., Somers, W.G., Devlin, G.P., Conaglen, J.V., Fowke, P. J., Bass, J. J (1999). Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol*, 180(1):1-9.
- Sifuentes-Romero, I., Merchant-Larios, H. & García-Gasca, A. (2010). Hox gene expression in the embryonic genital system of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholt, 1829), a species with temperature-dependent sex determination. *Gene Expr. Patterns* 10 (6): 290-8.
- Smyth, G. K., Yang, Y. H., Speed, T. P. (2002). Statistical issues in cDNA microarray data analysis, in: Brownstein M. J., Khodursky A. B. (Eds.), *Functional Genomics: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Humana Pres, Totowa.
- Sparre, P. & Venema, S. C. (1995). Introducción a la evaluación de los recursos pesqueros tropicales. Manual. FAO. Doc. Téc. de la Pesca 306/1. Valparaíso, Chile. 420p.
- Stewart, C.E.H. & Rittwegger, J. (2006). Adaptive processes in skeletal muscle: Molecular regulators and genetic influences. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 6(1):73-86.
- Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J. & Kambadur, R. (2000). Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem*, 275: 40235-40243.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3: 1-11.

- Vianello, S., Brazzoduro, L., Dalla Valle, L., Belvedere, P. & Colombo, L. (2003). Myostatin expression during development and chronic stress in zebrafish (*Danio rerio*). *J Endocrinol*, 176(1):47-59.
- Wei, Y., Yong, Z., Yanfeng, L., Zhenguo, W., Dahai, Z. (2006). Myostatin Induce Cyclin D1 Degradation to Cause Cell Cycle Arrest through a Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT/GSK-3 β Pathway and is Antagonized by Insulin-like Growth Factor 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 3799-3808.
- Welsch, U. & Sobotta, J. (2009). Histología. Editorial Médica Panamericana. Segunda Edición. pp: 151- 173.
- Xu, C., Wu, G., Zohar, Y., Du, S.J. (2003). Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *J Exp Biol*, 206: 4067-4079.
- Ye, H.Q, Chen, S. L, Sha, Z. X. & Liu, Y. (2007).Molecular Cloning and Expression Analysis of the Myostatin Gene in Sea Perch (*Lateolabrax japonicus*).*Mar Biotechnol*, 9(2):262-72.
- Yun, K. & Wold, B. (1996).Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context. *Current Opinion in Cell Biology*, 8 (6): 877–889.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*, 7 (1-2):203-14.

ANEXOS 1

A) Síntesis cDNA

- 1.- Mezclar 5 ml RNA + 1 ml Random primers, mantener todos reactivos en hielo.
- 2.- Incubar a 70°C por 10 minutos. Poner en hielo 30 segundos después de incubar, posteriormente centrifugar un poco y regresar a hielo.
- 3.- Preparar mezcla en hielo.

Mezcla para síntesis de cDNA	
Reactivo	1 x
Agua DEPC	7.7
Buffer 5x M-MLV	4
dNTP's	1
RNAsin	0.5
M-MLV	0.8
Volumen total	14 ml

- 4.- Añadir 14 ml de la mezcla a cada tubo.
- 5.- Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 6.- Incubar a 45°C por 1hr (temperatura óptima para MMLV forme cadena doble)
- 7.- Incubar a 90°C – 95°C por 5 minutos.
- 8.-Poner en hielo 1 minuto, centrifugar para bajar todo.
- 9.- Almacenar a -20°C.

B) Extracción de RNA con trizol con 2 digestiones

- 1.- Retirar el RNA later de las muestras.
- 2.- Homogeneizar en 500 ml de trizol (primero 250 ml).
- 3.- Pasar el tejido a través de una jeringa.
- 4.- Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Añadir 100 ml de cloroformo y agitar vigorosamente.

- 6.- Incubar a temperatura ambiente por 3 minutos.
- 7.- Centrifugar a 12000 g por 15 minutos a 4°C.
- 8.- Transferir sobrenadante a un tubo limpio.
- 9.- Añadir 250 ml de isopropanol al tubo con sobrenadante y agitar un poco.
- 10.- Dejar precipitar toda la noche a 4°C.
- 11.- Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- 12.- Centrifugar a 12000 g por 10 minutos a 4°C.
- 13.- Retirar sobrenadante.
- 14.- Añadir 500 ml de etanol al 70% (al pellet).
- 15.- Centrifugar a 12000 g por 5 minutos a 4°C.
- 16.- Retirar sobrenadante.
- 17.- Añadir 50 ml de agua DEPC y resuspender pellet.
- 18.- Tratamiento con DNAsa I:

Mezcla para extracción de RNA	
Reactivo	1 x
Agua DEPC	8
Buffer 10xDNAsa	3.5
RNA sin	0.5
DNAsa I	3
Volumen total	15 ml

- 19.- Agregar 15 ml de la mezcla a cada tubo.
- 20.- Incubar 30 minutos a 37°C.
- 21.- Añadir 6.5 ml de liol 4M.
- 22.- Añadir 65 ml de fenolcloroformo y dar vortex.
- 23.- Centrifugar 10 minutos a temperatura ambiente.
- 24.- Transferir sobrenadante a un tubo limpio.
- 25.- Agregar 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
- 26.- Precipitar por 2 hrs. a -80°C ó toda la noche a -20°C.
- 27.- Centrifugar 15 minutos a 12000 g a 4°C.
- 28.- Retirar sobrenadante.
- 29.- Añadir 500 ml de etanol al 70%.
- 30.- Centrifugar 15 minutos a 12000g a 4°C.

31.- Retirar sobrenadante.

32.- Agregar 50 ml de agua DEPC para resuspender el pellet, repetir a partir de paso 16.

33.-Una vez repetidos los pasos se agrega 40 ml de agua DEPC para resuspender el pellet final.

C) Purificación de producto de PCR cortados de gel.

1.- Pesar un tubo de 1.5 ml antes de cortar el gel.

2.- Cortar el fragmento del gel con navaja de bisturí estéril, ponerlo en el tubo y pesar nuevamente.

3.- Añadir Membrana Binding Solution 10 ml de solución por cada 10 mg de agarosa.

4.- Incubar entre 50°C y 65°C por 10 minutos, vortex cada dos o tres minutos o hasta que la agarosa se haya disuelto por completo.

NOTA: geles de agarosa >1% puede requerir más tiempo de incubación. Es muy importante que la agarosa se haya disuelto por completo.

5.- Colocar una columna en un tubo colector por cada muestra.

6.- Transferir el DNA a la columna e incubar 1 minuto.

NOTA: A la columna solo le caben 350 ml de solución. Si se tiene un volumen mayor será necesario pasar el DNA en varias centrifugadas.

7.- Centrifugar 1 minuto a 12000 rpm y descartar lavado.

8.- Lavar con 700 ml de Membrane Wash Solution (revisar que se le añadió etanol).

9.- Centrifugar 1 minuto y descartar el lavado.

10.- Lavar con 500 ml de Membrane Wash Solution.

11.- Centrifugar 5 minutos y descartar lavado.

12.- Volver a poner la columna en el tubo colector y centrifugar 1 minuto más en seco.

13.- Transferir la columna a un tubo de 1.5 ml limpio.

14.- Añadir 25-50 ml de agua libre de nucleasas e incubar 1 minuto.

15.- Centrifugar 1 minuto y almacenar a -20°C.

NOTA: Los pasos 14 y 15 pueden realizarse 2 veces, agregando el agua en dos tiempos antes de almacenar a -20°C.

D) Ligación

Al producto de purificación de PCR se le agrega la siguiente mezcla maestra:

Con pGEMT Easy Vector

Mezcla para ligación	
Reactivo	1 x
Buffer 2x ligation	10 ml
PGEMT Easy vector	1 ml
DNA purificado	8 ml
DNA Ligasa (T4)	1 ml
Volumen total	20 ml

1.- Incubar por 2 horas a temperatura ambiente ó toda la noche a 4°C.

2.- Almacenar a -20°C.

E) Transformación

1.- Preparar cajas de Petri LB-Amp (dejar secar aproximadamente 30 minutos).

2.- Agregar a las cajas X-gal, IPTG.

Se prepara en el momento:

-- X-gal	16 ml (50 mg/ml)
-- dimetil formamida	24 ml
	40 ml Total – en cada caja
-- IPTG	7 ml

3.- Sacar bacterias de -80°C, ponerlas directo en hielo y dejar que se descongelen.

- 4.- Mezclar: Vector + Inserto Vector: Ligación 5 ml + 50 ml bacterias (ya están en alícuota)
- 5.- Incubar en hielo por 30 minutos.
- 6.- Choque térmico a 37°C por 20 segundos.
- 7.- Regresar al hielo por 2 minutos.
- 8.- Incubar en 1.5 ml de SOC (en campana), primero se agregan 750 ml a tubo falcon y los restantes 750 ml al tubo eppendorf con las bacterias. Después transferir todo al tubo falcon.
- 9.- Incubar a 37°C (baño maría) con agitación por 1 hora.
- 10.- Transferir todo a tubos eppendorf.
- 11.- Centrifugar a máxima (8000 rpm) por 5 minutos a temperatura ambiente.
- 12.- Descartar sobrenadante y resuspender el pellet en el residual.
- 13.- Inocular en cajas de LB-Amp – 10 µl caja en una caja y restante (más de 10 µl) en otra caja
- 14.- Incubar toda la noche a 37°C.

F) Levantamiento de colonias

- 1.- Preparar LB fresco en la campana (matraz).
- 2.- Preparar 1 ml LB – 2.4 ampicilina
Agregar 10 ml LB – 2.4 ml ampicilina
26 ml LB – 62.4 ml ampicilina
- 3.- Distribuir en 13 tubos falcon, 2 ml de LB-Ampicilina por tubo (el número de tubos corresponde al número de colonias que se levanten).
- 4.- Levantar las colonias más aisladas con un palillo de madera y colocar una por tubo.
- 5.- Incubar a 37°C con agitación a 240 rpm toda la noche con baño maría.

G) Minipreps (tratamiento alcalino para obtener plásmido)

- 1.- Transferir 1.5 ml de cultivo bacteriano a un tubo eppendorf.
- 2.- Centrifugar 1 minuto a máxima a 12,000 rpm y eliminar sobrenadante totalmente.
- 3.- Agregar 100 µl de cell resuspension solution y resuspender el pellet:

Preparación: 50 mM tris-HCL pH 8.0

10 mM EDTA pH 8.0 ---- 2 µg de RNAsa

Para 1 ml Tris --- 2.5 µl RNAsa

1.2 ml Tris --- 3 µl RNAsa

400 µl Tris --- 1 µl RNAsa

- 4.- Agregar 100 µl de buffer de lisis (200 mM NaOH y 1% SDS) y mezclar.
NOTA: Tomar ½ volumen del total ó preparar, ya que la solución esta al 400 mM de NaOH y 2% SDS.
- 5.- Agregar 120 µl de buffer de neutralización (3 M acetato de potasio, pH 5.5 y mezclar por 3 minutos).
- 6.- Centrifugar 1 minuto a máxima a 12,000 rpm y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo (se puede formar como nata de sobrenadante, se debe retirar con la misma punta, cuidando no transferirlo con el sobrenadante al tubo limpio).
- 7.- Agregar 200µl de isopropanol y mezclar.
- 8.- Centrifugar 1 minuto a máxima a 12,000 rpm y descartar el sobrenadante.
- 9.- Agregar 500µl de etanol al 70% y mezclar.
- 10.- Centrifugar 1 minuto a máxima a 12,000 rpm y descartar el sobrenadante, volver a centrifugar y eliminar el sobrenadante con punta.
- 11.- Agregar 25µl de agua estéril y re-suspender el pellet.
- 12.- Realizar digestión enzimática.

NOTA: No es necesario realizar el procedimiento en campana.

H) Digestión

Preparar:

Mezcla para digestión	
Reactivo	1 x
Agua 18 Ω esteril	7.1
Buffer H 10 x	1
BSA 100 x	0.1
EcoR I	0.8
Volumen total	9 ml

- 1.- Distribuir 9 µl de la mezcla en casa tubo.
- 2.- Agregar 1 µl de DNA minipreps.
- 3.- Incubar a 37°C por 2 horas.
- 4.- Correr el gel de agarosa al 1% (45 minutos).

I) Preparación de medio LB-AMP

- 1.- Pesar el medio

Para 500 ml: Medio LB 12.5 g

Bacto Agar 7.5 g

dH₂O 450 ml (agua desionizada o destilada)

Utilizando LB agar (Lennok Lbagar) solo pesar 16 g y aforar a 500 ml.

- 2.- Esterilizar medio LB.

- 3.- Agregar alícuota de ampicilina al medio esterilizado cuando este tibio.

NOTA: Preparación alícuota ampicilina, debe estar a la concentración 25 mg/ml.

Agregar 120 ml Amp (25 mg/ml) en 50 ml LB.

Agregar 1.2 ml Amp (25 mg/ml) en 500 ml LB.

Concentración final 60 µg/ml.

* Ampicilina nueva está a concentración de 100 mg/ml, por lo tanto se debe de hacer dilución 1:4 para llevarla a 25 mg/ml.

- 4.- Vaciar medio LB-Amp en caja de Petri.

- 5.- Esperar a que solidifique medio en cajas de Petri (15-20 min).

- 6.- Guardar cajas de Petri con medio LB-Amp en su empaque una vez que este sólido, ponerlas boca abajo.

7.- Almacenarlas en refrigerador hasta que sean usadas.

NOTA: Se pueden utilizar hasta 3 meses después de preparadas. No exceder de 3 meses en ser utilizadas. Desecharlas una vez que ha pasado este tiempo y no fueron utilizadas.

J) SÍNTESIS DE cDNA para RACE

1.- Preparar los siguientes Mix:

3' RACE	Reactivo	5' RACE
2 µl	5x first-strand buffer	2 µl
1 µl	DDT 20 mM	1 µl
1 µl	dNTP Mix 10 nM	1 µl
4 µl	Volumen total	4 µl

2.- Por separado preparar la siguiente reacción:

3' RACE	Reactivo	5' RACE
2.75 µl	H ₂ O desionizada	1.75 µl
1 µl	CDS Primer A	1 µl
3 µl	*RNA	3 µl
6.75 µl	Volumen total	5.75 µl

*Puede ser de 1.5 µl

3.- Incubar ambas reacciones 72°C por 3 minutos y 42°C por 2 minutos.

4.- Centrifugar para bajar todo.

5.- Agregar 1 µl de SMARTER II A oligo solo a la reacción de 5' RACE cDNA del paso 2.

6.- Agregar a cada reacción del paso 1 lo siguiente:

Reactivo	
4 μ l	Buffer Mix del paso 1
0.25 μ l	RNAasa Inhibidor 40 U/ μ l
1 μ l	SMART Scribe RT (transcriptasa reversa)
5.25 μ l	Volumen total

NOTA: El paso anterior se puede realizar mientras transcurren las incubaciones del paso 3.

7.- Agregar el Master Mix del paso 6 (5.25 μ l) al RNA desnaturalizado de los pasos 2 y 5 (3' RACE cDNA y 5' RACE cDNA) para un total de 12 μ l, mezclar y centrifugar para bajar todo.

8.- Incubar a 42°C por 90 minutos.

9.- Incubar a 70°C por 10 minutos.

10.- Diluir cDNA 3' y 5' en 20 μ l de Tricina EDTA.

11.- Muestras pueden ser conservadas a -20°C por 3 meses.

K) PCR RACE 5' – 3'

Muestras: 5' y 3' RACE cDNA

Polimerasa clontech buffer 2

Primers: Lg-mstn-qPCR

1.- Preparar Master Mix:

Mezcla para PCR RACE	
Reactivo	1 x
H ₂ O grado PCR	10.1
Buffer 10x advantage	1.5
dNTP Mix (10 mM)	0.3
Polimerasa advantage	0.3
Volumen total	12.2

2.- Repartir 12.2 μ l en cada tubo.

3.- En tubos con Master Mix agregar:

Mezclas para 5' RACE				
tubo	1	2 (+)	3 (-)	4 (-)
5' RACE cDNA	1 µl	1 µl	1 µl	-
UPM (10x)	1.5	-	1.5	-
GSP 1 R	0.3	0.3	-	0.3
GSP 2 F	-	0.3	-	0.3
H ₂ O	-	1.2	1	2.2

Mezclas para 3' RACE		
tubo	5	6 (+)
3' RACE cDNA	1 µl	1 µl
UPM (10x)	1.5	-
GSP 1 R	-	0.3
GSP 2 F	0.3	0.3
H ₂ O	-	1.2

Condiciones del programa

Desnaturalización	95°C	5 minutos
	95°C	30 segundos (30 ciclos)
Alineación	66°C	30 segundos (30 ciclos)
Extensión	68°C	3 minutos (30 ciclos)
Extensión final	68°C	10 minutos
Hold	4°C	

L) PCR RACE ANIDADO 5'

1.- Diluir 2.5 µl del PCR inicial en 122.5 µl del buffer tricina-EDTA.

2.- Preparar Master Mix:

Mezcla para PCR RACE anidado	
Reactivo	1 x
H ₂ O grado PCR	10.1
Buffer 10x advantage	1.5
dNTP Mix (10 nM)	0.3
Polimerasa advantage	0.3

3.- Repartir 12.2 μ l en cada tubo.

4.- En los tubos con el Master Mix agregar:

Mezcla para RACE ANIDADO		
Reactivo	Muestra	control negativo
PCR inicial	1 μ l	-
Nested primer	1.5	0.3
GSP 1 R	0.3	0.3
H ₂ O	-	2.2

Condiciones del programa

Desnaturalización	94°C	30 segundos	(25 ciclos)
Alineación	65°C	30 segundos	(25 ciclos)
Extensión	68°C	3 minutos	(25 ciclos)

ANEXOS 2

1. Objetivo 2.

1.1 Expresión génica miostatina

Edad	Ct	EDAD	Ct	Edad	Ct	Edad	Ct
10hrs	0	28dpe	2.72E-03	56chico	2.13E-03	70chico	0
10hrs	0	28dpe	4.74E-03	56chico	4.85E-03	70chico	2.87E-03
10hrs	1.85E-03	28dpe	4.11E-07	56chico	2.27E-03	70chico	0
10hrs	3.11E-03	28dpe	4.26E-06	56chico	0.0124	70chico	0
10hrs	0	28dpe	0.0102	56chico	0.0133	70med	0
10hrs	0.0101	35dpe	1.38E-04	56med	0.0161	70med	0
14hrs	0	35dpe	6.18E-05	56med	5.96E-03	70med	0
14hrs	0	35dpe	9.02E-05	56med	1.33E-03	70med	0
14hrs	0	35dpe	3.86E-05	56med	0	70med	0
14hrs	0	35dpe	0.0289	56med	7.55E-04	70gde	3.11E-03
14hrs	0	35dpe	1.10E-03	56med	2.61E-04	70gde	6.24E-04
14hrs	7.95E-06	42dpe	0.0165	56gde	3.28E-04	70gde	0
0dpe	0	42dpe	9.25E-03	56gde	3.15E-04	70gde	8.98E-04
0dpe	5.73E-06	42dpe	0.0142	56gde	0	70gde	0
0dpe	4.91E-06	42dpe	1.77E-03	56gde	6.25E-04	70gde	0
0dpe	4.86E-06	42dpe	4.62E-03	56gde	3.56E-03	77chico	0.0219
0dpe	0	42dpe	7.63E-04	56gde	0	77chico	0.0146
0dpe	0	49chico	2.48E-03	63chico	0.0242	77chico	3.70E-03
7dpe	4.86E-04	49chico	2.13E-04	63chico	5.39E-04	77chico	1.30E-03
7dpe	8.92E-05	49chico	1.31E-03	63chico	1.31E-03	77chico	0.0105
7dpe	2.33E-04	49chico	5.24E-04	63chico	0.0199	77chico	4.31E-03
7dpe	3.01E-04	49chico	0.0154	63chico	0	77med	0
7dpe	3.33E-04	49chico	1.47E-03	63chico	7.24E-03	77med	1.14E-03
7dpe	1.67E-04	49med	6.83E-03	63med	0.0122	77med	6.47E-03
14dpe	3.59E-04	49med	7.08E-04	63med	5.99E-03	77med	4.69E-04
14dpe	1.33E-06	49med	1.24E-03	63med	3.97E-03	77med	1.62E-03
14dpe	2.14E-04	49med	3.30E-04	63med	1.62E-03	77med	3.84E-04
14dpe	2.23E-07	49med	5.93E-04	63med	3.99E-03	77gde	6.57E-04
14dpe	6.28E-04	49med	2.65E-04	63med	0	77gde	1.17E-03
14dpe	1.70E-07	49gde	1.48E-03	63gde	7.57E-03	77gde	1.36E-04
21dpe	1.20E-03	49gde	4.63E-03	63gde	0.0235	77gde	0
21dpe	1.11E-03	49gde	1.22E-03	63gde	0.0253	77gde	8.73E-04
21dpe	5.03E-04	49gde	0	63gde	0	77gde	2.81E-06
21dpe	8.69E-04	49gde	4.80E-03	63gde	0.0651	84chico	0.011
21dpe	4.84E-04	49gde	3.30E-03	70chico	0	84chico	9.99E-04
21dpe	8.77E-04	56chico	9.27E-04	70chico	0	84chico	3.76E-03

Expresión génica miostatina continuación

Edad	Ct	Edad	Ct	Edad	Ct	Edad	Ct
84chico	6.76E-04	84gde	9.49E-05	91chico	1.51E-03	91gde	6.83E-04
84chico	5.47E-04	84gde	2.14E-03	91chico	7.54E-04	91gde	2.34E-03
84chico	6.50E-04	84gde	1.16E-03	91chico	1.51E-03	91gde	1.26E-03
84med	1.01E-05	84gde	1.14E-03	91med	5.35E-04	91gde	4.95E-03
84med	1.32E-03	84gde	1.21E-03	91med	6.11E-04	91gde	2.16E-05
84med	2.01E-03	84gde	6.29E-04	91med	8.28E-04	91gde	3.95E-04
84med	5.61E-03	91chico	5.23E-03	91med	6.19E-06		
84med	8.20E-04	91chico	8.61E-04	91med	4.94E-04		
84med	8.22E-04	91chico	4.55E-03	91med	1.15E-03		

1.2 ANOVA 1 vía 10hrs-42dpe

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	8	0.0305	0.00381	3.631	<0.05
Residual	44	0.0462	0.00105		
Total	52	0.0766			

1.3 Comparaciones pareadas método Fisher (LSD) 10hrs-42dpe (Figura 20)

Comparación	Diff of Means	P	Diff>LSD	Comparación	Diff of Ranks	Q	P<0.05
42dpe vs. 14hpf	0.0798	<0.001	SI	35dpe vs. 7dpe	0.0239	0.209	NO
42dpe vs. 0dpe	0.0791	<0.001	SI	35dpe vs. 21dpe	0.0112	0.554	NO
42dpe vs. 14dpe	0.0701	<0.001	SI	35dpe vs. 10hpf	0.00653	0.729	NO
42dpe vs. 7dpe	0.0644	0.001	SI	10hpf vs. 14hpf	0.0327	0.087	NO
42dpe vs. 21dpe	0.0517	0.008	SI	10hpf vs. 0dpe	0.0321	0.093	NO
42dpe vs. 10hpf	0.047	0.016	SI	10hpf vs. 14dpe	0.0231	0.223	NO
42dpe vs. 35dpe	0.0405	0.036	SI	10hpf vs. 7dpe	0.0173	0.359	NO
42dpe vs. 28dpe	0.0353	0.079	NO	10hpf vs. 21dpe	0.00463	0.806	NO
28dpe vs. 14hpf	0.0445	0.028	SI	21dpe vs. 14hpf	0.0281	0.14	NO
28dpe vs. 0dpe	0.0438	0.031	SI	21dpe vs. 0dpe	0.0275	0.149	NO
28dpe vs. 14dpe	0.0348	0.083	NO	21dpe vs. 14dpe	0.0185	0.329	NO
28dpe vs. 7dpe	0.0291	0.146	NO	21dpe vs. 7dpe	0.0127	0.5	NO
28dpe vs. 21dpe	0.0164	0.409	NO	7dpe vs. 14hpf	0.0154	0.414	NO
28dpe vs. 10hpf	0.0117	0.553	NO	7dpe vs. 0dpe	0.0147	0.435	NO
28dpe vs. 35dpe	0.0052	0.792	NO	7dpe vs. 14dpe	0.00577	0.759	NO
35dpe vs. 14hpf	0.0393	0.042	SI	14dpe vs. 14hpf	0.00965	0.609	NO
35dpe vs. 0dpe	0.0386	0.045	SI	14dpe vs. 0dpe	0.00898	0.634	NO
35dpe vs. 14dpe	0.0296	0.12	NO	0dpe vs. 14hpf	0.000666	0.972	NO

1.4 ANOVA 1 vía 49-91dpe

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	6	0.0516	0.0086	5.79	<0.05
Residual	117	0.174	0.00149		
Total	123	0.225			

1.5 Comparaciones pareadas método Fisher (LSD) 49-91dpe (Figura 21)

Comparación	Diff of Means	LSD(alpha=0.050)	P	Diff >= LSD
63.000 vs. 70.000	0.0756	0.0262	<0.001	SI
63.000 vs. 91.000	0.0511	0.0258	<0.001	SI
63.000 vs. 84.000	0.0479	0.0258	<0.001	SI
63.000 vs. 49.000	0.0432	0.0258	0.001	SI
63.000 vs. 56.000	0.0394	0.0258	0.003	SI
63.000 vs. 77.000	0.039	0.0258	0.003	SI
77.000 vs. 70.000	0.0366	0.0258	0.006	SI
77.000 vs. 91.000	0.0121	0.0254	0.348	NO
77.000 vs. 84.000	0.00884	0.0254	0.493	NO
77.000 vs. 49.000	0.00415	0.0254	0.747	NO
77.000 vs. 56.000	0.000362	0.0254	0.978	NO
56.000 vs. 70.000	0.0362	0.0258	0.006	SI
56.000 vs. 91.000	0.0117	0.0254	0.363	NO
56.000 vs. 84.000	0.00848	0.0254	0.51	NO
56.000 vs. 49.000	0.00378	0.0254	0.769	NO
49.000 vs. 70.000	0.0324	0.0258	0.014	SI
49.000 vs. 91.000	0.00795	0.0254	0.537	NO
49.000 vs. 84.000	0.0047	0.0254	0.715	NO
84.000 vs. 70.000	0.0277	0.0258	0.036	SI
84.000 vs. 91.000	0.00325	0.0254	0.801	NO
91.000 vs. 70.000	0.0245	0.0258	0.063	NO

1.6 ANOVA 1 vía 10hpf-91dpe

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	15	0.0904	0.00603	4.41	<0.05
Residual	161	0.22	0.00137		
Total	176	0.31			

1.7 Comparaciones pareadas método Fisher (LSD) 10hrs-91dpe (Figura 22)

Comparación	Diff of Means	P	Diff>LSD	Comparación	Diff of Means	P	Diff>LSD
63d vs. 14h	0.0848	<0.001	SI	28d vs. 10h	0.0117	0.601	NO
63d vs. 0d	0.0842	<0.001	SI	28d vs. 91d	0.0108	0.564	NO
63d vs. 70d	0.0756	<0.001	SI	28d vs. 84d	0.00756	0.686	NO
63d vs. 14d	0.0752	<0.001	SI	28d vs. 35d	0.0052	0.817	NO
63d vs. 7d	0.0694	<0.001	SI	28d vs. 49d	0.00286	0.878	NO
63d vs. 21d	0.0567	0.001	SI	49d vs. 14h	0.0416	0.018	SI
63d vs. 10h	0.0521	0.003	SI	49d vs. 0d	0.0409	0.02	NO
63d vs. 91d	0.0512	<0.001	SI	49d vs. 70d	0.0324	0.01	NO
63d vs. 84d	0.0479	<0.001	SI	49d vs. 14d	0.032	0.068	NO
63d vs. 35d	0.0456	0.01	SI	49d vs. 7d	0.0262	0.135	NO
63d vs. 49d	0.0432	<0.001	SI	49d vs. 21d	0.0135	0.44	NO
63d vs. 28d	0.0404	0.033	SI	49d vs. 10h	0.00886	0.612	NO
63d vs. 56d	0.0394	0.002	SI	49d vs. 91d	0.00794	0.52	NO
63d vs. 77d	0.0391	0.002	SI	49d vs. 84d	0.00469	0.704	NO
63d vs. 42d	0.00505	0.774	NO	49d vs. 35d	0.00234	0.894	NO
42d vs. 14h	0.0798	<0.001	SI	35d vs. 14h	0.0393	0.068	NO
42d vs. 0d	0.0791	<0.001	SI	35d vs. 0d	0.0386	0.072	NO
42d vs. 70d	0.0706	<0.001	SI	35d vs. 70d	0.0301	0.089	NO
42d vs. 14d	0.0701	0.001	SI	35d vs. 14d	0.0296	0.167	NO
42d vs. 7d	0.0644	0.003	SI	35d vs. 7d	0.0239	0.265	NO
42d vs. 21d	0.0517	0.017	SI	35d vs. 21d	0.0112	0.602	NO
42d vs. 10h	0.047	0.029	SI	35d vs. 10h	0.00653	0.76	NO
42d vs. 91d	0.0461	0.009	SI	35d vs. 91d	0.00561	0.748	NO
42d vs. 84d	0.0429	0.015	SI	35d vs. 84d	0.00236	0.893	NO
42d vs. 35d	0.0405	0.06	NO	84d vs. 14h	0.0369	0.036	NO
42d vs. 49d	0.0382	0.03	NO	84d vs. 0d	0.0362	0.039	NO
42d vs. 28d	0.0353	0.117	NO	84d vs. 70d	0.0277	0.028	NO
42d vs. 56d	0.0344	0.05	NO	84d vs. 14d	0.0273	0.12	NO
42d vs. 77d	0.034	0.053	NO	84d vs. 7d	0.0215	0.219	NO
77d vs. 14h	0.0458	0.009	SI	84d vs. 21d	0.0088	0.614	NO
77d vs. 0d	0.0451	0.011	SI	84d vs. 10h	0.00417	0.811	NO
77d vs. 70d	0.0366	0.004	SI	84d vs. 91d	0.00325	0.792	NO
77d vs. 14d	0.0361	0.04	SI	91d vs. 14h	0.0337	0.055	NO
77d vs. 7d	0.0303	0.083	NO	91d vs. 0d	0.033	0.06	NO
77d vs. 21d	0.0176	0.313	NO	91d vs. 70d	0.0245	0.052	NO
77d vs. 10h	0.013	0.456	NO	91d vs. 14d	0.024	0.17	NO
77d vs. 91d	0.0121	0.328	NO	91d vs. 7d	0.0182	0.297	NO
77d vs. 84d	0.00885	0.474	NO	91d vs. 21d	0.00554	0.751	NO
77d vs. 35d	0.00649	0.71	NO	91d vs. 10h	0.000918	0.958	NO
77d vs. 49d	0.00416	0.736	NO	10h vs. 14h	0.0327	0.127	NO

77d vs. 28d	0.00129	0.945	NO	10h vs. 0d	0.0321	0.135	NO
77d vs. 56d	0.000384	0.975	NO	10h vs. 70d	0.0235	0.182	NO
56d vs. 14h	0.0454	0.01	SI	10h vs. 14d	0.0231	0.281	NO
56d vs. 0d	0.0447	0.011	SI	10h vs. 7d	0.0173	0.418	NO
56d vs. 70d	0.0362	0.004	SI	10h vs. 21d	0.00463	0.829	NO
56d vs. 14d	0.0357	0.042	SI	21d vs. 14h	0.0281	0.19	NO
56d vs. 7d	0.03	0.087	NO	21d vs. 0d	0.0275	0.2	NO
56d vs. 21d	0.0173	0.323	NO	21d vs. 70d	0.0189	0.283	NO
56d vs. 10h	0.0126	0.469	NO	21d vs. 14d	0.0185	0.388	NO
56d vs. 91d	0.0117	0.343	NO	21d vs. 7d	0.0127	0.552	NO
56d vs. 84d	0.00846	0.493	NO	7d vs. 14h	0.0154	0.471	NO
56d vs. 35d	0.00611	0.726	NO	7d vs. 0d	0.0147	0.491	NO
56d vs. 49d	0.00377	0.76	NO	7d vs. 70d	0.00622	0.724	NO
56d vs. 28d	0.000908	0.961	NO	7d vs. 14d	0.00577	0.787	NO
28d vs. 14h	0.0445	0.049	SI	14d vs. 14h	0.00965	0.652	NO
28d vs. 0d	0.0438	0.052	NO	14d vs. 0d	0.00898	0.674	NO
28d vs. 70d	0.0353	0.062	NO	14d vs. 70d	0.00045	0.98	NO
28d vs. 14d	0.0348	0.122	NO	70d vs. 14h	0.0092	0.601	NO
28d vs. 7d	0.0291	0.196	NO	70d vs. 0d	0.00853	0.628	NO
28d vs. 21d	0.0164	0.466	NO	0d vs. 14h	0.000666	0.975	NO

2. Objetivo 3

2.1 Comparaciones pareadas método Dunn 42-91 dpe en Peso

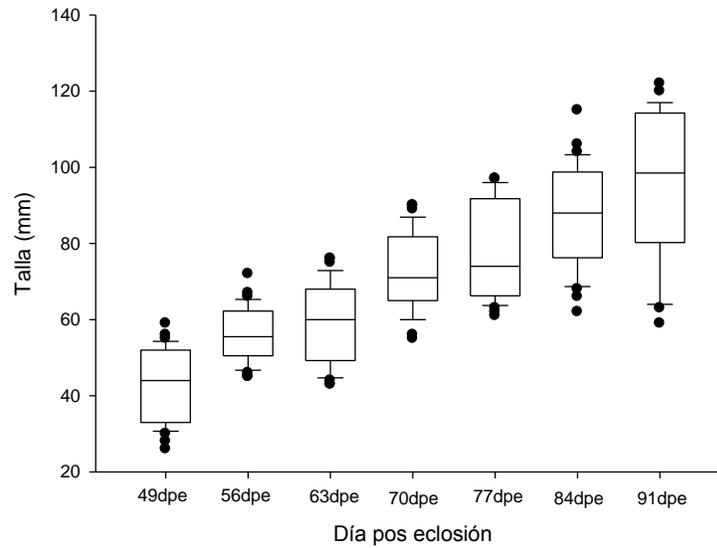
Comparación	Diff of Ranks	Q	P<0.05
91d vs 49d	171.472	9.981	SI
91d vs 56d	132.306	7.701	SI
91d vs 63d	119.194	6.938	SI
91d vs 70d	60.25	3.507	SI
91d vs 77d	38.361	2.233	NO
91d vs 84d	6.528	0.38	NO
84d vs 49d	164.944	9.601	SI
84d vs 56d	125.778	7.321	SI
84d vs 63d	112.667	6.558	SI
84d vs 70d	53.722	3.127	NO
84d vs 77d	31.833	1.853	NO
77d vs 49d	133.111	7.748	SI
77d vs 56d	93.944	5.468	SI
77d vs 63d	80.833	4.705	SI
77d vs 70d	21.889	1.274	NO
70d vs 49d	111.222	6.474	SI
70d vs 56d	72.056	4.194	SI

70d vs 63d	58.944	3.431	SI
63d vs 49d	52.278	3.043	SI
63d vs 56d	13.111	0.763	NO
56d vs 49d	39.167	2.28	NO

2.2 Comparaciones pareadas método Dunn 42-91 dpe en Talla

Comparación	Diff of Ranks	Q	P<0.05
91d vs 49d	174.181	10.138	SI
91d vs 56d	133.583	7.775	SI
91d vs 63d	116.722	6.794	SI
91d vs 70d	58.569	3.409	SI
91d vs 77d	41.556	2.419	NO
91d vs 84d	11.569	0.673	NO
84d vs 49d	162.611	9.465	SI
84d vs 56d	122.014	7.102	SI
84d vs 63d	105.153	6.121	SI
84d vs 70d	47	2.736	NO
84d vs 77d	29.986	1.745	NO
77d vs 49d	132.625	7.72	SI
77d vs 56d	92.028	5.357	SI
77d vs 63d	75.167	4.375	SI
77d vs 70d	17.014	0.99	NO
70d vs 49d	115.611	6.729	SI
70d vs 56d	75.014	4.366	SI
70d vs 63d	58.153	3.385	SI
63d vs 49d	57.458	3.344	SI
63d vs 56d	16.861	0.981	NO
56d vs 49d	40.597	2.363	NO

Crecimiento en talla



2.3 Crecimiento en talla durante el desarrollo juvenil

2.4 Comparaciones pareadas con el método de Fisher (LSD)

Comparación	Diferencia de medias	LSD(alpha=0.050)	P	Diff >= LSD
GPO1 vs. GPO5	0.0354	0.0292	0.018	SI
GPO1 vs. GPO4	0.0297	0.0236	0.014	SI
GPO1 vs. GPO6	0.0152	0.0376	0.425	NO
GPO1 vs. GPO2	0.0116	0.022	0.297	NO
GPO1 vs. GPO3	0.000409	0.0241	0.973	NO
GPO3 vs. GPO5	0.035	0.0294	0.02	SI
GPO3 vs. GPO4	0.0293	0.0238	0.016	SI
GPO3 vs. GPO6	0.0148	0.0378	0.44	NO
GPO3 vs. GPO2	0.0112	0.0223	0.32	NO
GPO2 vs. GPO5	0.0238	0.0277	0.091	NO
GPO2 vs. GPO4	0.018	0.0217	0.103	NO
GPO2 vs. GPO6	0.00357	0.0365	0.847	NO
GPO6 vs. GPO5	0.0202	0.0412	0.333	NO
GPO6 vs. GPO4	0.0145	0.0375	0.446	NO
GPO4 vs. GPO5	0.00576	0.029	0.694	NO

2.5 Comparaciones pareadas con el método Fisher LSD (ANOVA 2 vías) Factor edad

Comparación	Diferencia de medias	LSD(alpha=0.050)	P	Diff >= LSD
63.000 vs. 70.000	0.0692	0.0304	<0.001	SI
63.000 vs. 49.000	0.0422	0.0338	0.015	SI
63.000 vs. 56.000	0.0367	0.0322	0.026	SI
63.000 vs. 91.000	0.0345	0.0298	0.024	SI
63.000 vs. 84.000	0.0308	0.0299	0.044	SI
63.000 vs. 77.000	0.0298	0.0301	0.052	No
77.000 vs. 70.000	0.0394	0.029	0.008	SI
77.000 vs. 49.000	0.0124	0.0325	0.451	No
77.000 vs. 56.000	0.00693	0.0308	0.657	NO
77.000 vs. 91.000	0.00471	0.0284	0.743	NO
77.000 vs. 84.000	0.000966	0.0284	0.946	NO
84.000 vs. 70.000	0.0384	0.0288	0.009	SI
84.000 vs. 49.000	0.0114	0.0323	0.484	NO
84.000 vs. 56.000	0.00596	0.0306	0.701	NO
84.000 vs. 91.000	0.00375	0.0281	0.792	NO
91.000 vs. 70.000	0.0347	0.0287	0.018	SI
91.000 vs. 49.000	0.0077	0.0323	0.638	NO
91.000 vs. 56.000	0.00222	0.0306	0.886	NO
56.000 vs. 70.000	0.0325	0.0312	0.041	SI
56.000 vs. 49.000	0.00548	0.0345	0.753	NO
49.000 vs. 70.000	0.027	0.0328	0.106	NO

3. Objetivo 4.

3.1 Comparaciones pareadas por el método de Fisher (LSD) entre órganos al 194dpe

Comparación	Diferencia entre medias	LSD(alpha=0.050)	P	Diff >= LSD
Cerebro vs. Intestino	0.077	0.0317	<0.001	SI
Cerebro vs. Hígado	0.0756	0.0317	<0.001	SI
Cerebro vs. Estómago	0.0715	0.0328	<0.001	SI
Cerebro vs. Riñón	0.0709	0.0317	<0.001	SI
Cerebro vs. Vejiga natatoria	0.0695	0.0317	<0.001	SI
Cerebro vs. Corazón	0.0651	0.0317	<0.001	SI
Cerebro vs. Branquia	0.0256	0.0317	0.111	NO
Cerebro vs. Ojo	0.00884	0.0317	0.58	NO
Cerebro vs. Músculo	0.000309	0.0317	0.985	NO
Músculo vs. Intestino	0.0767	0.0317	<0.001	SI
Músculo vs. Hígado	0.0753	0.0317	<0.001	SI
Músculo vs. Estómago	0.0712	0.0328	<0.001	SI

Músculo vs. Riñón	0.0706	0.0317	<0.001	SI
Músculo vs. Vejiga natatoria	0.0692	0.0317	<0.001	SI
Músculo vs. Corazón	0.0648	0.0317	<0.001	SI
Músculo vs. Branquia	0.0253	0.0317	0.116	NO
Músculo vs. Ojo	0.00853	0.0317	0.593	NO
Ojo vs. Intestino	0.0682	0.0317	<0.001	SI
Ojo vs. Hígado	0.0668	0.0317	<0.001	SI
Ojo vs. Estómago	0.0626	0.0328	<0.001	SI
Ojo vs. Riñón	0.0621	0.0317	<0.001	SI
Ojo vs. Vejiga natatoria	0.0607	0.0317	<0.001	SI
Ojo vs. Corazón	0.0563	0.0317	<0.001	SI
Ojo vs. Branquia	0.0168	0.0317	0.294	NO
Branquia vs. Intestino	0.0514	0.0317	0.002	SI
Branquia vs. Hígado	0.05	0.0317	0.002	SI
Branquia vs. Estómago	0.0459	0.0328	0.007	SI
Branquia vs. Riñón	0.0453	0.0317	0.006	SI
Branquia vs. Vejiga natatoria	0.0439	0.0317	0.007	SI
Branquia vs. Corazón	0.0395	0.0317	0.015	SI
Corazón vs. Intestino	0.0119	0.0317	0.455	NO
Corazón vs. Hígado	0.0105	0.0317	0.512	NO
Corazón vs. Estómago	0.00634	0.0328	0.701	NO
Corazón vs. Riñón	0.00579	0.0317	0.716	NO
Corazón vs. Vejiga natatoria	0.0044	0.0317	0.782	NO
Vejiga natatoria vs. Intestino	0.00752	0.0317	0.637	NO
Vejiga natatoria vs. Hígado	0.00606	0.0317	0.704	NO
Vejiga natatoria vs. Estómago	0.00194	0.0328	0.906	NO
Vejiga natatoria vs. Riñón	0.00139	0.0317	0.93	NO
Riñón vs. Intestino	0.00612	0.0317	0.701	NO
Riñón vs. Hígado	0.00467	0.0317	0.77	NO
Riñón vs. Estómago	0.000548	0.0328	0.973	NO
Estómago vs. Intestino	0.00558	0.0328	0.735	NO
Estómago vs. Hígado	0.00412	0.0328	0.803	NO
Hígado vs. Intestino	0.00146	0.0317	0.927	NO

1 **Expression of myostatin in the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) during larval**
2 **and juvenile development under cultured conditions**

3

4 Julia Torres-Velarde ¹, Leonardo Ibarra-Castro ², Estela Rodríguez-Ibarra ², Itzel Sifuentes-
5 Romero ¹, Rubí Hernández-Cornejo ¹, and Alejandra García-Gasca ^{1*}

6

7 ¹ Laboratory of Molecular Biology, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo
8 (CIAD), Avenida Sábalo-Cerritos s/n, Mazatlán, Sinaloa 82010, Mexico

9

10 ² Laboratory of Reproduction and Marine Finfish Hatchery, Centro de Investigación en
11 Alimentación y Desarrollo (CIAD), Avenida Sábalo-Cerritos s/n, Mazatlán, Sinaloa
12 82010, Mexico

13

14

15

16 *Corresponding author

17 Laboratory of Molecular Biology, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo
18 (CIAD), Avenida Sábalo-Cerritos s/n, Mazatlán, Sinaloa 82010, Mexico

19 E-mail: alegar@ciad.mx

20 Tel.: +52-669-989-8700 (ext. 277)

21 Fax: +52-669-989-8701.

22

23

24

25

ABSTRACT

26 Myostatin is a member of the TGF- β family, and considered a negative regulator of
27 myocyte proliferation and differentiation. Since its discovery and because of the important
28 role it performs, it has become a target for biotechnological applications in commercial
29 species. In this study we present the developmental expression pattern of myostatin in the
30 spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* under culture conditions. Since *L. guttatus* is a
31 commercially important species, the purpose of this study was to lay the foundation for
32 applying, in the near future, gene silencing strategies to accelerate muscle growth and
33 improve production. The full coding sequence of myostatin from *L. guttatus* was isolated
34 from muscle tissue and sequenced, obtaining 1134 nucleotides which encode a peptide of
35 377 amino acids. Expression levels were measured in embryonic, larval, and juvenile stages
36 by qPCR. Myostatin expression was detected in embryonic stages, and maintained at low
37 levels until 28 days post-hatch, when it showed a significant increase, coinciding with the
38 onset of metamorphosis. After that, expression was fluctuating, coinciding probably with
39 periods of rapid and slow muscle growth or individual growth rates. Myostatin expression
40 was also analyzed by weight with higher levels detected in smaller animals, irrespective of
41 age. Myostatin is also expressed in other tissues from *L. guttatus*, presenting higher levels
42 in brain, eye, and gill, indicating that in fish, myostatin participates in physiological
43 processes, other than muscle growth.

44

45 **Keywords:** *Myostatin, muscle growth, fish aquaculture, Lutjanus guttatus, gene expression*

46

47 1. INTRODUCTION

48 In vertebrates, muscle is the most abundant tissue, contributing between 40 to 50% of the
49 body weight (Welsch & Sobotta, 2009). Myogenesis starts during embryonic development
50 and, in fish, fiber number increases mainly during larval and juvenile stages, decreasing in
51 adulthood (Koumans & Akster, 1995; Rescan et al., 2001; Rescan, 2005). This process is
52 positively regulated by muscle-specific transcription factors such as Myo-D, Myf-5 (which
53 are required for stem cells to commit to the myogenic lineage), MRF-4, and myogenin
54 (which regulate the transition of committed stem cells to become multinucleated
55 myofibers), and negatively regulated by several factors such as tumor necrosis factor-alpha
56 (TNF- α), ubiquitin ligases like the muscle ring finger 1 (MuRF1), muscle atrophy f box o
57 Atrogin (1MAFbx), and the growth differentiation factor-8 (GDF-8) also known as
58 myostatin (Mstn) (Stewart & Rittweger, 2006; Lee, 2010).

59 Myostatin belongs to the transforming growth factor-beta family (TGF- β) (Lee, 2010;
60 McPherron et al., 1997) and was initially identified in cattle presenting a double muscled
61 phenotype; in these animals the *Mstn* gene contained a deletion encoding a non-functional
62 protein (Grobet et al., 1997). Also, *Mstn*-null mice show a substantial increment of muscle
63 mass, twice as much as their wild type counterparts (McPherron et al., 1997; Lee, 2007).
64 These experiments identified GDF-8 as a negative regulator of muscle growth, which later
65 received the name of myostatin (Rodino-Klapac et al., 2009). Further studies in different
66 species, even in humans, have confirmed the role of Mstn as negative regulator of muscle
67 growth (Schuelke et al., 2004; Acosta et al., 2005; Clop et al., 2006; Mosher et al., 2007).
68 The *Mstn* gene consists of three exons encoding, in humans, a 376 amino acid protein
69 precursor which contains an N-terminal propeptide, a cleavage site RSRR, and a C-terminal
70 active peptide (Rodino-Klapac et al., 2009; Lee, 2010). The *Mstn* transcript has been
71 sequenced in several fish species such as *Oryzias latipes* (Sawatari et al., 2010),
72 *Lateolabrax japonicus* (Ye et al., 2007), *Danio rerio* (Xu et al., 2003), *Sparus aurata*
73 (Maccatrozzo et al., 2001), *Oncorhynchus mykiss* (Rescan et al., 2001), and *Salmo salar*
74 (Ostbye et al., 2001) among others. In fish, different *Mstn* isoforms have been documented,
75 which are expressed in different tissues such as brain, gill, eye, ovary, and intestine
76 (Roberts & Goetz, 2001; Rodgers et al., 2001; Rescan et al., 2001; Ostbye et al., 2001;

77 Garikipati et al., 2006; Helterline et al., 2007; Garikipati et al., 2007), suggesting myostatin
78 performs functions other than limiting muscle growth (Funkenstein et al., 2009).
79 The myostatin pathway has been blocked in fresh water fish to obtain a giant phenotype, for
80 instance, Carpio et al. (2009) generated a recombinant soluble form of the activin receptor
81 (ActRIIB) N-terminal domain from goldfish (*Carassius auratus*) which was administered
82 by intra-peritoneal injections to larvae and juveniles of this and two other species, the
83 African catfish (*Clarias gariepinus*) and tilapia (*Oreochromis aureus*), obtaining a dose-
84 dependent increase in muscle growth. Also, the myostatin transcript has been silenced by
85 RNAi. Acosta et al. (2005) administered dsRNA by microinjection to zebrafish embryos
86 producing hyperplasia and hypertrophy of muscle cells, obtaining fish with an increased
87 muscle mass. These strategies may be applied to cultured marine fish in order to accelerate
88 muscle growth and improve production.
89 The spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) is a marine fish cultured in Mexico, it is
90 commercially important in several Latin American countries, and its demand surpasses
91 fisheries production (Abdo-de la Parra et al., 2010; Álvarez-Lajonchère et al., 2012). In
92 order to establish a procedure to silence myostatin to promote muscle growth in *L. guttatus*,
93 the transcript and expression patterns during larval and juvenile development should be
94 characterized; under this context we report the sequence of the full-coding region of the
95 myostatin transcript of *L. guttatus*, as well as the expression levels during development and
96 in different tissues from juvenile fish.

97

98 **2. MATERIALS AND METHODS**

99 *2.1 Experimental animals*

100 Fertilized eggs of spotted rose snapper were obtained from a captive broodstock held in the
101 marine finfish hatchery of the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo
102 (CIAD), located in the city of Mazatlan, northwest Mexico. Culture conditions and larval
103 feeding protocols have been reported elsewhere (Galaviz et al., 2012). Eggs were sampled
104 at 10 and 14 hours post-fertilization (hpf) (corresponding to segmentation, and appearance
105 of internal organs and caudal fin, respectively); then from day 0 post-hatch (dph) to 42 dph
106 samples were collected every seven days with six replicates, each replicate contained from

107 2 to 50 larvae depending on size. During juvenile development, muscle tissue was
108 dissected, collecting 18 samples of muscle (each sample consisted of muscle tissue from
109 two animals) every seven days, from 49 to 91 dph, when juveniles reached ~20 g. Fish
110 were measured and weighed as reported in Galaviz et al. (2012). Dissection animals were
111 placed in ice-chilled water and washed with distilled water beforehand larvae and tissues
112 were preserved in RNAlater (Ambion, Uniparts, Mexico) and stored at -20°C until use.
113

114 *2.2 Isolation of the myostatin transcript from muscle*

115 Total RNA was isolated from muscle tissue from juveniles using Trizol Reagent
116 (Invitrogen, Accesolab, Mexico) following the instructions of the manufacturer. RNA was
117 digested with DNase I (Promega, Uniparts, Mexico) to eliminate genomic DNA
118 contamination. Synthesis of cDNA was performed at 42°C using the MMLV reverse
119 transcriptase (Promega, Uniparts, Mexico) and random primers. Degenerate primers were
120 designed from myostatin sequences from other fish species using the PRIMER 3 software
121 (Rozen & Skaletsky, 2000). All primers were synthesized in Sigma-Aldrich, Mexico.
122 Primer sets to obtain the 5' and 3' regions of the *Mstn* transcript were Fish-Mstn-F1/R1 and
123 Fish-Mstn-F2/R2 respectively (Table 1).
124 PCR reactions were performed with GoTaq® Flexi polymerase (Promega, Uniparts,
125 Mexico) under the following conditions: one cycle at 94°C 2 min, 40 cycles at 95°C 1 min,
126 57°C 1 min, and 72°C 1 min, rendering fragments of ~550 and ~600 bp for the 5' and 3'
127 regions respectively. Fragments were gel-purified and ligated into a pGEM-T vector
128 (Promega, UNIPARTS, Mexico) using T4 ligase according to manufacturer's protocol.
129 Transformation was performed with *Escherichia coli* DH5α competent cells (Invitrogen,
130 Accesolab, Mexico). Positive clones were sequenced in Macrogen, Inc (South Korea).
131 Sequences were manually edited using BioEdit and submitted to BLAST (Basic Local
132 Alignment Search Tool) from NCBI (National Center for Biotechnology Information).
133 With this strategy, the full coding sequence of the muscle isoform of the myostatin
134 transcript of *Lutjanus guttatus* was obtained. In order to know if this isoform was Mstn1 or
135 Mstn2, a phylogenetic analysis was performed in which Euclidian distances were measured
136 using the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) algorithm,

137 coupled to the Jukes Cantor model using the MEGA 4 software. Myostatin sequences to
138 perform this analysis were obtained from GenBank according to Rodgers et al. (2007) and
139 Rodgers & Garikipati (2008).

140

141 *2.3 Real-time PCR*

142 Total RNA was isolated from eggs, larvae, and juveniles as described in section 2.2,
143 followed by cDNA synthesis. Gene-specific primers were designed for qPCR analysis
144 (qPCR-Lg-Mstn-F/R, Table 1), amplifying fragments no longer than 200 bp. Two reference
145 genes were considered for this analysis, 18S rRNA and β -actin, stability of both genes was
146 evaluated according to Llera-Herrera et al. (2012) and β -actin proved to be the most stable,
147 therefore we decided to use this gene as internal control; primers for β -actin are shown in
148 Table 1. Amplification efficiency for both myostatin (0.91) and β -actin (1.05) was
149 calculated according to Llera-Herrera et al. (2012) based on Bustin et al. (2009). Real-time
150 PCR analysis was performed in a CFX96 thermal cycler (Bio-Rad, Mexico) using Eva
151 Green® Supermix 2X (Bio-Rad, Mexico), under the following conditions: 95°C for 30 s;
152 40 cycles at 95°C 20 s, 60°C 20 s. Gene expression was calculated according to Sifuentes-
153 Romero et al. (2010) with the comparative CT method from Livak & Schmittgen (2001).

154

155 *2.3 Statistical analysis*

156 Δ CT values were converted to their linear form using the $2^{-\Delta CT}$ equation (Livak and
157 Schmittgen, 2001). Gene expression results were square root-transformed in order to reach
158 normality and variance equality (Meuwissen & Goddard, 2003, Smyth et al., 2002). One
159 way ANOVA coupled to the Fisher (LSD) test for multiple comparisons was performed
160 using SigmaPlot v11 in order to find statistical differences in myostatin expression levels
161 ($P < 0.05$) between age groups. A Kruskal-Wallis one way ANOVA with a Tukey test for
162 multiple comparisons was carried out to find significant differences ($P < 0.05$) in weight gain
163 between age groups. Myostatin expression and weight were compared by Pearson's
164 correlation. Samples were then divided in weight groups, based on the mean weight value
165 (6.6 g). One-way ANOVA coupled to the Fisher (LSD) test for multiple comparisons was

166 also performed to find significant differences in myostatin expression levels per weight
167 group, irrespective of age.

168

169 *2.4 Myostatin expression in non-muscle tissues*

170 Total RNA was isolated from eight fish at 194 dpe, followed by cDNA synthesis as
171 explained in section 2.2. Myostatin expression was evaluated in heart, eye, brain, stomach,
172 kidney, swim bladder, gill, liver, intestine, and muscle. qPCR analysis was performed as
173 explained in section 2.3. One-way ANOVA followed by a Fisher (LSD) test for multiple
174 comparisons was performed to find statistical significant differences in myostatin gene
175 expression levels between organs.

176

177 **3. RESULTS**

178 *3.1 Isolation of myostatin from muscle*

179 The full coding region of the muscle myostatin transcript from *L. guttatus* was obtained,
180 and consisted of 1134 nucleotides, encoding a 377 amino acid peptide. This sequence was
181 submitted to GenBank (accession no. **JX987064**) (Figure 1). The sequence included the
182 three exons and the proteolytic processing site RXRR, necessary for the activation of the
183 peptide, and present in all TGF- β family members (Lee, 2010). Phylogenetic analysis
184 indicated that the isolated transcript was Mstn-1 according to the classification proposed by
185 Rodgers et al. (2007) and Rodgers & Garikipati (2008) (Figure 2).

186 *3.2 Myostatin expression during development of L. guttatus.*

187 *Mstn* was detected in embryos at 10 hpf, however this expression was considered to be of
188 maternal origin. After 10 hpf, expression levels decreased to almost undetected from 14 hpf
189 to 21 dpe, then, at 28 dpe expression levels increased, maintaining fluctuating levels until
190 the end of the sampling period at day 91 (Figure 3).

191 Statistical analysis indicated that day 63 showed significant differences ($P < 0.05$) with all
192 other days except day 42. This is relevant since this was the age presenting maximum

193 expression levels followed by a dramatic drop in gene expression at day 70 (Figure 3), due
194 probably to a negative feedback in the regulatory pathway.

195 During juvenile development, no significant differences in weight gain were detected from
196 days 49 to 56 ($P=0.78$), 56 to 63 ($P=0.99$), and 70 to 77 ($P=0.40$) (Figure 4) coinciding with
197 significant increments in myostatin expression levels.

198 The correlation between weight and myostatin expression was low but significant ($r=-$
199 0.195 , $p=0.03$, $n=124$) indicating that smaller animals showed higher expression levels
200 (Figure 5); when weight groups were separated irrespective of age, organisms weighing
201 less than the mean weight (6.6 g) showed higher expression levels of myostatin than larger
202 animals (Figure 6), indicating that myostatin expression was higher in fish with slower
203 growth rates, which were most of the sampled fish (65%). One-way ANOVA indicated
204 significant differences between the two groups ($P=0.002$).

205

206 *3.4 Myostatin expression in other organs*

207 Myostatin was expressed in all organs analyzed at 194 dph. Higher expression levels were
208 detected in muscle, brain, eye, and gills, which did not show significant differences with
209 each other, but did show significant differences with intestine, liver, stomach, kidney, swim
210 bladder, and heart ($P<0.05$); these organs were not different from each other (Figure 7).

211 Myostatin expression in digestive organs was low at this age.

212

213 **4. DISCUSSION**

214 The myostatin transcript (*Mstn-1*) from *L. guttatus* presents the same characteristics
215 reported for *Mstn* transcripts from other species, and from other molecules belonging to the
216 TGF- β family. The active peptide region contains the nine conserved cysteines required for
217 intramolecular disulfide bond formation (Roberts & Goetz, 2001, Ostbye et al., 2001,
218 Maccatrozzo et al., 2001; Saunders et al., 2006; Garikipati et al., 2006; Garikipati et al.,
219 2007; Ye et al., 2007; Sawatari et al., 2010). Additionally, four more cysteines, two
220 required for latent protein (LAP) monomer formation, and other two required for the union
221 of the two bioactive terminal regions, are present. While the nine cysteines are present in all

222 TGF- β members, the additional four cysteines are only present in myostatin orthologs
223 (Rodgers et al., 2001). The sequence obtained from *L. guttatus* muscle corresponds to
224 *Mstn-1*, according to the phylogenetic analysis reported by Rodgers & Garikipati (2008).
225 It has been documented that *Mstn* expression in fish is detected before blastula stage
226 because of maternal transfer, then dropping abruptly (Vianello et al., 2003; Helterline et al.,
227 2007; De Santis et al., 2012) as observed in this study. These results suggest that myostatin
228 in fish may be involved in muscle development during early stages (Helterline et al., 2007)
229 and cells rapidly commit to the myogenic pathway; this occurs because fish embryos need
230 to move rapidly at the time of hatch, in contrast with amniot embryos, in which this process
231 occurs until somitogenesis (Currie & Ingham, 2001).
232 Helterline et al. (2007) studied *Mstn-1* expression in zebrafish by qPCR, finding higher
233 levels at 4 hpf, presumably due to maternal transfer, then expression dropped to almost
234 undetectable levels at gastrulation (7 hpf). After blastula stage, myostatin expression
235 increases, although this was not detected in *L. guttatus*, probably due to the rapid
236 absorption of the viteline sac (about 40 hours post-hatch (hph)). These differences may be
237 associated to the rapid development of *L. guttatus*, as reported for *Lates calcarifer* (De
238 Santis et al., 2012) which is faster than in zebrafish. Nevertheless, *L. calcarifer* presented
239 higher levels of *Mstn* expression at the time of hatch, decreasing at 3 hph, increasing again
240 at 30 hph, then decreasing to minimum levels because of the high growth rate observed
241 during this period (De Santis et al., 2012). Finally, at 21 dph, expression levels increase
242 (similar to *L. guttatus* at 28 dph), coinciding to the beginning of metamorphosis (De Santis
243 et al., 2012, Alvarez-Lajonchère et al., 2012). These results indicate, as suggested by
244 Rodgers et al. (2001), that myostatin is not constitutively expressed, but expression is
245 regulated depending on muscle growth and development.
246 Our data indicate that in *L. guttatus* *Mstn-1* is expressed at low levels during embryonic and
247 early larval development as described in other fish species (Roberts & Goetz, 2003,
248 Helterline et al., 2007, De Santis et al., 2012), showing a significant increment at the onset
249 of metamorphosis (28 dph), then expression fluctuates during juvenile stages coinciding
250 probably with periods of rapid and slow growth rates or individual growth rates.
251 The low correlation coefficient between weight and myostatin expression obtained in this
252 study has been reported by other authors; for instance, correlation between myostatin

253 expression and muscle growth was not found after spawning, captivity or fasting (Rescan
254 2005; Rescan et al., 2001; Vianello et al., 2003; Rodgers et al., 2003), also no correlation
255 was found in the mouse between muscle atrophy and myostatin over-expression (Carlson et
256 al., 1999). These results may respond to factors other than myostatin affecting somatic
257 growth, such as the growth hormone (GH), since the GH-CSE (growth hormone cell
258 specific element) site has been detected in the promoter region of myostatin from
259 *Salvelinus fontinalis* and *Ictalurus punctatus*, suggesting a relationship between myostatin
260 and the GH (Roberts & Goetz, 2003). Furthermore, the levels of the active peptide may
261 produce a negative feedback in the transcription of myostatin, as suggested by an increase
262 of *Mstn* expression at 63 dph, followed by an abrupt drop at 70 dph.

263 When fish were divided by weight groups irrespective of age, *Mstn* expression was higher
264 in organisms smaller than 6.6 g (which was the mean weight value). This is interesting
265 because the fish reach 6.6 g at 70-77 dph, these are late stages of juvenile development, and
266 between 28 and 70 dph the growth rate is slow. After 7 g, fish grow faster until they reach
267 20 g, when *Mstn* expression levels increase again. Therefore, myostatin participates in the
268 regulation of the growth rate in this species during juvenile development.

269 It has been speculated that in fish *Mstn-1* apparently inhibits muscle hyperplasia but not
270 hypertrophy, and that *Mstn-2* may be needed to inhibit hypertrophy (De Santis et al., 2012).
271 Roberts & Goetz (2003) reported the existence of different binding sites in promoter
272 regions from myostatin-1 (NFkB, GRE, ARE) and myostatin-2 (SF-1), suggesting that
273 myostatin paralogues are differentially regulated to participate in different processes.

274 Functions of myostatin other than muscle growth should be considered before attempting
275 gene silencing. It has been reported in *Danio rerio* that expression of *Mstn-1* was high in
276 brain, muscle, heart, eye, testis, and spleen (Helterline et al., 2007). Also, in *Lateolabrax*
277 *japonicus*, expression was detected in brain, muscle, eye, and, in a lesser extent, in gill,
278 liver, spleen, and heart (Ye et al., 2007); both studies agree with our finding in *L. guttatus*
279 since *Mstn* was expressed in several organs, especially in brain, muscle, eye, and gill,
280 therefore multiple organ expression seems to be common among teleost species (Rescan et
281 al., 2001; Maccatrozzo et al., 2001; Robert & Goetz 2001; Koncabas et al.; 2002; Ye et al.,
282 2007). The brain is especially interesting, since *Mstn* expression in this organ seems to be a
283 common event, and expression levels are high in *L. guttatus*. Preliminary data of *Mstn*

284 expression in the brain of *L. guttatus* indicates the presence of a splice variant of *Mstn-1*, in
285 which a 75 bp deletion was detected in the first exon (nt 104-178 of the coding sequence);
286 since both *Mstn-1* and the splice variant are expressed in brain, our current results of gene
287 expression could be the product of a co-amplification of both isoforms, although further
288 investigation should be performed in order to confirm these observations. A similar
289 situation has been reported for *O. mykiss*, in which *Mstn-2b* presents a 51 bp deletion in the
290 second exon, and it is not known whether this variant is a pseudogene, or whether it is
291 functionally active (Garikipati et al., 2007). Further studies are required to understand the
292 role of different myostatin isoforms in non-muscular tissues of teleost species.

293

294 **5. CONCLUSION**

295 The full coding region of *Mstn-1* was isolated from muscle tissue in *L. guttatus*. Expression
296 data indicate that *Mstn-1* is expressed at low levels during embryonic and early larval
297 development, coinciding with the myogenic process. At day 28 after hatch, a significant
298 increment in gene expression was detected coinciding with the onset of metamorphosis.
299 From 28 to 91 dph expression levels fluctuate coinciding probably with individual growth
300 rates or periods of faster / slower growth. Higher expression levels of *Mstn-1* were detected
301 in smaller juvenile fish regardless of age, indicating its participation as negative regulator
302 of somatic growth. As in other teleost species, myostatin is expressed in several tissues,
303 presenting higher levels in brain, eye, and gill (besides muscle) of juvenile fish. Further
304 studies are required to investigate the role of myostatin in tissues other than muscle, as well
305 as the presence and function of different isoforms.

306

307 **6. ACKNOWLEDGMENTS**

308 The authors would like to thank all the people working in the marine finfish hatchery at
309 CIAD, especially Emir Peña, Omar Ochoa, Angel Rojo and Armando Ibarra for assistance
310 in producing, maintaining, and collecting *L. guttatus* eggs, larvae, juveniles and organs; to
311 Isabel Abdo, Noemi García-Aguilar, and Gabriela Velasco for technical assistance; to
312 Bruno Gómez-Gil, Ravi Sangha, and Miguel Betancourt for their constructive comments to

313 this work. We also thank the National Council for Science and Technology (CONACYT
314 grant 179098) for the financial support granted to JTV and AGG.

315

316 7. REFERENCES

317 Abdo-De la Parra, M.I., Rodríguez-Ibarra, L.E., Campillo-Martínez, F., Velasco-Blanco,
318 G., García-Aguilar, N., Álvarez-Lajonchère, L.S., Voltolina, D. 2010. Efecto de la
319 densidad de siembra sobre el crecimiento y supervivencia larval del pargo lunarejo
320 *Lutjanus guttatus*. Rev. biol. mar. oceanogr. Valparaíso, 45: 141-146.

321 Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., González, O., Estrada, M.P. 2005. Myostatin gene
322 silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. J Biotechnol, 10; 119:324-31.

323 Álvarez-Lajonchère, L., Abdo de la Parra, M. I., Rodríguez-Ibarra, L. E., Velasco-Blanco,
324 G., Puello-Cruz, A. C., González-Rodríguez, B., Ibarra-Soto, A., Ibarra-Castro, L.
325 2012.The Scale-up of Spotted Rose Snapper, *Lutjanus guttatus*, Larval Rearing at
326 Mazatlan, Mexico. Journal of the word of the Aquaculture society, Vol. 43, No. 3

327 Bustin, S.A., Benes,V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett,J., Kubista,M., Mueller,R.,
328 Nolan,T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T. 2009. The
329 MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative Real-Time
330 PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55: 611-622.

331 Carlson, C. J., Booth FW, Gordon SE. 1999. Skeletal muscle myostatin mRNA expression
332 is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol*, 277(2
333 Pt 2):R601-6.

334 Carpio, Y., Acosta, J., Morales, R., Santisteban, Y., Sanchez, A., Estrada, M.P. 2009.
335 Regulation of body mass growth through activin type IIB receptor in teleost fish.
336 Gen Comp Endocrinol 160: 158-167.

337 Clop, A., Marcq, F., Takeda, H., Pirottin, D., Tordoir, X., Bibé, B., Bouix, J., Caiment, F.,
338 Elsen, J. M., Eychenne, F., Laezul, C., Laville, E., Meish, F., Milenkovic, D., Tobin,
339 J., Charlier, C., Georges, M. 2006. A Mutation creating a potential illegitimate

340 microRNA target site in the myostatin gene effects muscularity in sheep. *Nat Genet*,
341 38: 813-818.

342 Currie, P. D., Ingham, P. W. 2001. Induction and patterning of embryonic skeletal muscle
343 cells in the zebrafish. *Fish Physiology*, Volume 18, Muscle Development and
344 Growth: 1–4, IN1–IN2, 5–17.

345 De Santis, C., Gomes, G.B., Jerry, D.R. 2012. Abundance of myostatin gene transcripts and
346 their correlation with muscle hypertrophy during the development of barramundi,
347 *Lates calcarifer*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 163:101-107.

348 Funkenstein, B., Balas, V., Rebhan, Y. & Pliatner, A. 2009. Characterization and functional
349 analysis of the 5' flanking region of *Sparus aurata* myostatin-1 gene. *Comp*
350 *Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*.153: 55-62.

351 Galaviz, M. A., García-Ortega, A., Gisbert, E., López, L. M., García-Gasca, A. 2012.
352 Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the
353 spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol*
354 *Biol*. 161, 9-16

355 Garikipati, D. K., Gahr, S. A., Roalson, E. H., Rodgers, B. D. 2007.Characterization of
356 Rainbow Trout Myostatin-2 Genes (rtMSTN-2a and -2b): Genomic Organization,
357 Differential Expression, and Pseudogenization. *Endocrinology*, 148:2106–2115.

358 Garikipati, D. K., Gahr, S. A., Rodgers, B. D. 2006. Identification, characterization, and
359 quantitative expression analysis of rainbow trout myostatin-1a and myostatin-1b
360 genes. *J Endocrinol*. 190:879-88.

361 Grobet, L., Martin, L. J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein,
362 A., Dunner, S., Menissier, F., Massabanda, J., Fries, R., Hanset, R., Georges, M.
363 (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscle
364 phenotype in cattle. *Nat Genet*, 17: 71-74.

- 365 Helterline, D., Garikipati, D., Stenkamp, D., Rodgers, B. 2007. Embryonic and tissue-
366 specific regulation of myostatin-1 and -2 gene expression in zebrafish. *Gen Comp*
367 *Endocrinol.* 151: 90-97.
- 368 Kocabas, A. M., Kucuktas, H., Dunham, R. A., Liu, Z. 2002. Molecular characterization
369 and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus*
370 *punctatus*). *Biochim Biophys Acta*, 1575: 99-107.
- 371 Kollias, H.D., McDermott, J.C. 2008. Transforming growth factor- β and myostatin in
372 skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 104: 579-587.
- 373 Koumans, J.T.M., Akster, H.A. 1995. Myogenic cells in development and growth of fish.
374 *Comp Biochem Physiol*, 110A: 3-20
- 375 Lee, S. J. 2010. Extracellular regulation of Myostatin: A molecular rheostat for muscle
376 mass. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem.* 10: 183-194.
- 377 Lee, S. J., 2007. Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF- β signaling pathways.
378 *PLoS ONE*2: e789.
- 379 Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-
380 time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25: 402–408.
- 381 Llera-Herrera, R., García-Gasca, A., Huvet, A., Ibarra, A.M. 2012. Identification of a
382 tubulin- α gene specifically expressed in testis and adductor muscle during stable
383 reference gene selection in the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Mar*
384 *Genomics.* 6: 33-44.
- 385 Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Radaelli, G., Mascarello, F., Patarnello, T. 2001.
386 Characterization of the Myostatin Gene in the Gilthead Seabream (*Sparus aurata*):
387 Sequence, Genomic Structure, and Expression Pattern. *Mar. Biotechnol.* 3: 224–
388 230.
- 389 McPherron, C.A., Lawler, M.A., Lee, S.J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in
390 mice by a new TGF-b superfamily member. *Nature* 387: 83-90.

- 391 Meuwissen, T. H., Goddard, M. E. 2003. Bootstrapping of gene-expression data improves
392 and controls the false discovery rate of differentially expressed genes. *Genet Sel*
393 *Evol.* 36: 191-205
- 394 Mosher, D. S., Quignon, P., Bustamante, C. D., Sutter, N. B., Mellersh, C. S., Parker, H.
395 G., Ostrander, E. A. 2007. A Mutation in the myostatin gene increases muscle mass
396 and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet*, 3: e79.
- 397 Ostbye, T.K., Galloway, T.F., Nielsen, C., Gabestad, I., Bardal, T., Andersen, O. 2001. The
398 two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of
399 tissues. *Eur. J. Biochem.* 268: 5249-5257.
- 400 Rescan, P. Y. 2005. Muscle growth patterns and regulation during fish ontogeny. *Gen*
401 *Comp Endocrinol.* 142:111-6.
- 402 Rescan, P. Y., Jutel, I., Rallièrre, C. 2001. Two myostatin genes are differentially expressed
403 in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol.* 204: 3523-
404 3529.
- 405 Roberts, S. B., Goetz, F. W. 2001. Differential skeletal muscle expression of myostatin
406 across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. *FEBS let.*
407 491: 212-216.
- 408 Roberts, S. B., Goetz, F. W. 2003. Myostatin protein and RNA transcript levels in adult and
409 developing brook trout. *Mol Cell Endocrinol.* 210: 9–20.
- 410 Rodgers, B. D., Garikipati, D. K. 2008. Clinical, Agricultural, and Evolutionary Biology of
411 Myostatin: A Comparative Review. *Endocrine Reviews*, 29: 513-534.
- 412 Rodgers, B. D., Weber, G. M., Kelley, K.M., Levine M. A. 2003. Prolonged fasting and
413 cortisol reduce myostatin mRNA levels in tilapia larvae; short-term fasting elevates.
414 *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284: R1277-86.
- 415 Rodgers, B. D., Weber, G. M., Sullivan, C. V., Levine, M. A. 2001. Isolation and
416 characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from

417 two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*.
418 Endocrinology, 142:1412-8.

419 Rodgers, B.D., Roalson, E.H., Weber, G. M., Roberts, S. B., Goetz, F. W. 2007. A
420 proposed nomenclature consensus for the myostatin gene family. Am J Physiol
421 Endocrinol Metab, 292: E371–E372

422 Rodino-Klapac, L.R., Haidet, A.M., Kaspar, B.K., Kota, J., Mendell J.R. 2009. Inhibition
423 of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. Muscle &
424 Nerve, 39: 283-296.

425 Rozen, S., Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist
426 programmers. Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols:
427 Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

428 Saunders, M.A., Good, J.M., Lawrence, E.C., Ferrell, R.E., Li, W.H., Nachman, M.W.
429 2006. Human adaptive evolution at Myostatin (GDF8), a regulator of muscle
430 growth. Am J Hum Genet, 79:1089-97.

431 Sawatari, E., Seki, R., Adachi, T., Hashimoto, H., Uji, S., Nakata, T., Kinoshita, M. 2010.
432 Overexpression of the dominant-negative form of myostatin results in doubling of
433 muscle-fiber number in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). Comp Biochem
434 Physiol A Mol Integr Physiol, 155:183-189.

435 Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L. E., Hübner C., Riebel, T., Kömen, W., Braun, T.,
436 Tobin, J. F., Lee, S. J. 2004. Myostatin mutation associated with gross muscle
437 hypertrophy in a child. N Engl J Med. 350:2682-2688.

438 Sifuentes-Romero I, Merchant-Larios H, García-Gasca, A. 2010. Hox gene expression in
439 the embryonic genital system of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz,
440 1829), a species with temperature-dependent sex determination. Gene Expr. Patterns
441 10: 290-8.

- 442 Smyth, G. K., Yang, Y. H., Speed, T. P. 2002. Statistical issues in cDNA microarray data
443 analysis, in: Brownstein M. J., Khodursky A. B. (Eds.), Functional Genomics:
444 Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Humana Pres, Totowa
- 445 Stewart, C.E.H., Rittwegger, J. 2006. Adaptive processes in skeletal muscle: Molecular
446 regulators and genetic influences. *J Musculo skelet Neuronal Interact*, 6:73-86.
- 447 Vianello, S., Brazzoduro, L., Dalla Valle, L., Belvedere, P., Colombo, L. 2003. Myostatin
448 expression during development and chronic stress in zebrafish (*Danio rerio*). *J*
449 *Endocrinol*, 176: 47-59.
- 450 Welsch, U., Sobotta, J. 2010. Histología. 2th ed. Editorial Médica Panamericana, España
451 pp: 151- 173.
- 452 Xu, C., Wu, G., Zohar, Y., Du, S.J. 2003. Analysis of myostatin gene structure, expression
453 and function in zebrafish. *J Exp Biol*. 206: 4067-4079.
- 454 Ye, H.Q, Chen, S. L, Sha, Z. X., Liu, Y. 2007. Molecular Cloning and Expression Analysis
455 of the Myostatin Gene in Sea Perch (*Lateolabrax japonicus*). *Mar Biotechnol*, 9:
456 262-72.
- 457
- 458

459

460

Table 1. Primer sequences used to isolate and quantify the myostatin transcript in *L. guttatus*

Primer name	Length	Tm	%GC	5'-3' Sequence
Fish-Mstn-F1	24	68.8	29.1	AAT GCA TCT GWC KCA SRT YRT GMT
Fish-Mstn-R1	20	69	55	ATC AGG CGG GAG ATY TGC AG
Fish-Mstn-F2	20	60.5	55	CTG CAR ATC TCC CGC CTG AT
Fish-Mstn-R2	21	54.6	47.6	AGC AYC CRC ARC GGT CYA CYA
qPCR-Lg-Mstn-F	20	65	60	TCC GCT CCC TGA AGA TCG AC
qPCR-Lg-Mstn-R	20	65.1	60	GTC ACG GCC AAG TCG TTT CC
Lg- β actina-F	18	65.9	66.7	CCA CGC CAT CCT GCG TCT
Lg- β actina-R	22	65.7	59.09	CTG GAC TTC GAG CAG GAG ATG G

461 F=forward; R= reverse, Tm= melting temperature, %GC = guanine/cytosine percentage, W=A/T,

462 K=G/T, S=C/G, R=A/G, Y=C/T, M=A/C

463

464

465

466 **Figure legends**

467 Figure 1. Myostatin full coding sequence from *L. guttatus*. The sequence contains 1134
468 nucleotides encoding for a 377 amino acid peptide. The conserved proteolytic
469 processing site (RARR) and the nine conserved cysteines are underlined.

470 Figure 2. Phylogenetic tree of myostatin orthologues in fish according to Rodgers et al.
471 (2007) and Rodgers & Garikipati (2008). Myostatin-1 seems to be more conserved
472 among fish species than myostatin-2. The sequence obtained from *L. guttatus*
473 muscle was myostatin-1 (box). Human and chicken myostatin sequences were used
474 as outgroups.

475 Figure 3. Expression of myostatin from 10 hpf (h) to 91 dph. Arrows indicate significant
476 differences ($P < 0.05$) in gene expression compared to 0 dph. From 10 hpf to 42 dph:
477 $n = 6$ replicates per day, each one containing between 2 to 50 individuals (eggs or
478 larvae); from 49 to 91 dph: $n = 18$ replicates per day, each one containing muscle
479 from two juveniles.

480 Figure 4. Juvenile growth represented by weight, from 49 to 91 dph ($n = 18$ replicates per
481 day, each one containing muscle from two juveniles). No significant differences in
482 weight were detected from 49 to 56 dph ($P = 0.78$), from 56 to 63 dph ($P = 0.99$), and
483 from 70 to 77 dph ($P = 0.4$), coinciding with significant increases of myostatin
484 expression.

485 Figure 5. Pearson's correlation between myostatin expression and weight. Correlation was
486 negative but not significant ($r = -0.195$, $p = 0.03$, $n = 124$) although smaller animals
487 showed higher expression levels of myostatin. The dashed line indicates the mean
488 weight (6.6 g).

489 Figure 6. Expression of myostatin in two weight groups: group 1 was composed of
490 juveniles weighting below the mean weight value (6.6 g), and group 2 was
491 composed of juveniles weighting above the mean weight value. Significant
492 differences were detected between the two groups ($P = 0.002$).

493 Figure 7. Expression of myostatin in different organs of *L. guttatus* at 194 dph (n=8 fish):
494 He) heart; Ey) eye; Br) brain; St) stomach; Ki) kidney; Sb) swim bladder; Gi) gill;
495 Li) liver; In) intestine; Mu) muscle. Expression of myostatin in eye, brain, gill and
496 muscle was not significantly different between each other but was different from all
497 other organs ($P < 0.05$).

498

499

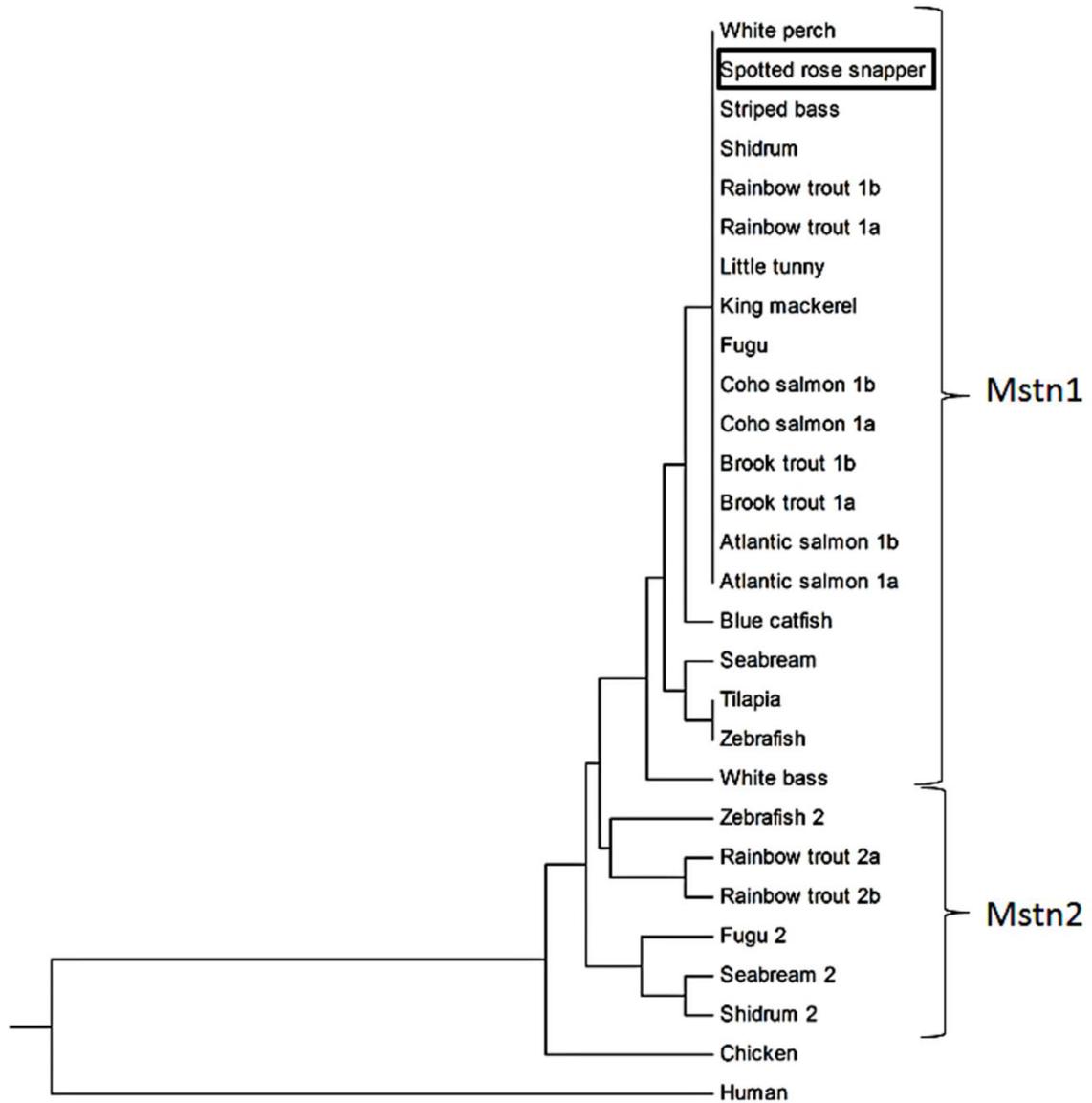
500

501 Figure 1

```
1  AUGCAUCUGACGCAGGUUGUGCUGUAUGUUAGCCUGCUCAUUGCUUUGGGUCCAGUAGUU 60
   M H L T Q V V L Y V S L L I A L G P V V
61  CUGAGUGACCAAGAGACGCACCAGCAGCAGCCUCCGCCAGCAGCCAGUGGACACG 120
   L S D Q E T H Q Q Q Q P S A S S P V D T
121 GAGCAGUGCGCUACCUUGCGAGGUCCGGCAGCAGAUUAAAACCAUGCGACUAAAACGCCAUC 180
   E Q C A T C E V R Q Q I K T M R L N A I
181 AAGUCUCAGAUUCUGAGCAAACUGCGGAUGAAAGAAGCUCCAAACAUCAGCCGAGACAUC 240
   K S Q I L S K L R M K E A P N I S R D I
241 GUGAAGCAGCUCCUGCCCAAGCGCCGCCUGCAGCAGCUUCUGACCCAGUACGACGUG 300
   V K Q L L P K A P P L Q Q L L D Q Y D V
301 CUGGGAGAUGAUACAGGGGAUGUGGUCUAGGAGGAGGACGAUGAGCAUGCCAUCACGGAG 360
   L G D D N R D V V M E E D D E H A I T E
361 ACGAUAUGAUGAUGGCCACUGGACCCGAGGCCAUCGUCCAGGUGGAUGGGGAACCAAGG 420
   T I M M M A T G P E A I V Q V D G E P R
421 UGCUGCUUUUUCUCUUUUACUCAAAAGUUUCAAGCCAAUCGCAUAGUCCGAGCGCAGCUC 480
   C C F F S F T Q K F Q A N R I V R A Q L
481 UGGGUGCAUCUGCGCGCGCGGAGGAGGCCACGGUGUCCUGCAGAUUCUCCGCCUG 540
   W V H L R A A E E A T T V F L Q I S R L
541 AUGCCGGUCACAGACGGGAACAGGCACAUAACGCAUCCGCUCCUGAAGAUCGACGUGAAC 600
   M P V T D G N R H I R I R S L K I D V N
601 GCCGGGGUCAGCUCUUGGCAAGUAUAGACGUCAAACAAGUGUUGAGCGUGUGGCUGCGG 660
   A G V S S W Q S I D V K Q V L S V W L R
661 CAGCCGGAGACCAACUGGGGCAUCGAGAUUAACGCCUUCGAUUCGAGGGGAAACGACUUG 720
   Q P E T N W G I E I N A F D S R G N D L
721 GCCGUGACCUCCCGCAGAGCCCGGAGAGGAAGGGCUGCAACCGUUCUAGGAGGUGAAGAUC 780
   A V T S A E P G E E G L Q P F M E V K I
781 UCAGAGGGCCCCAAGCGUGCAAGGAGAGACUCAGGUCUGGACUGUGACGAGAACUCUCCA 840
   S E G P K R A R R D S G L D C D E N S P
841 GAGUCCCGUUGCUGCGGUUACCCGUCACAGUGGACUUUGAAGACUUUGGCUGGGACUGG 900
   E S R C C R Y P L T V D F E D F G W D W
901 AUUAUUGCCCCAAGCGCUACAAGGCCAACUAUUGCUCCGGGGAGUGGAGUACAUGCAC 960
   I I A P K R Y K A N Y C S G E C E Y M H
961 UUGCAAAAGUACCCACACACCCACCUGGUGAACAAAGCCAAACCCAGAGGGACCGCUGGC 1020
   L Q K Y P H T H L V N K A N P R G T A G
1021 CCCUGCUGUACCCCCACCAAGAUGUCGCCCAUCAACAUGCUCUACUUUACCGAAAAGAG 1080
   P C C T P T K M S P I N M L Y F N R K E
1081 CAGAUAUCUAUGGCAAGAUCCCUUCAUGGUGGUGGACCGCUGGGUGCUAA 1134
   Q I I Y G K I P S M V V D R C G C *
```

502

503 Figure 2



504

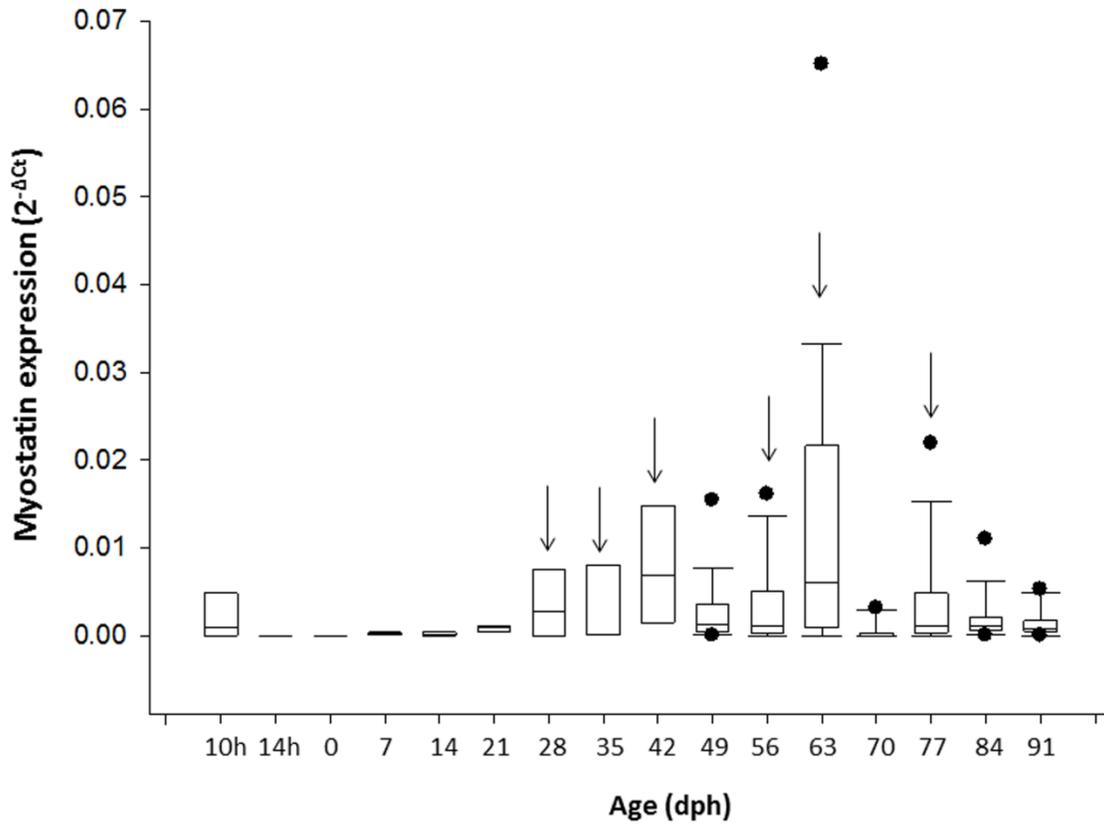
505

506

507

508 Figure 3

509



510

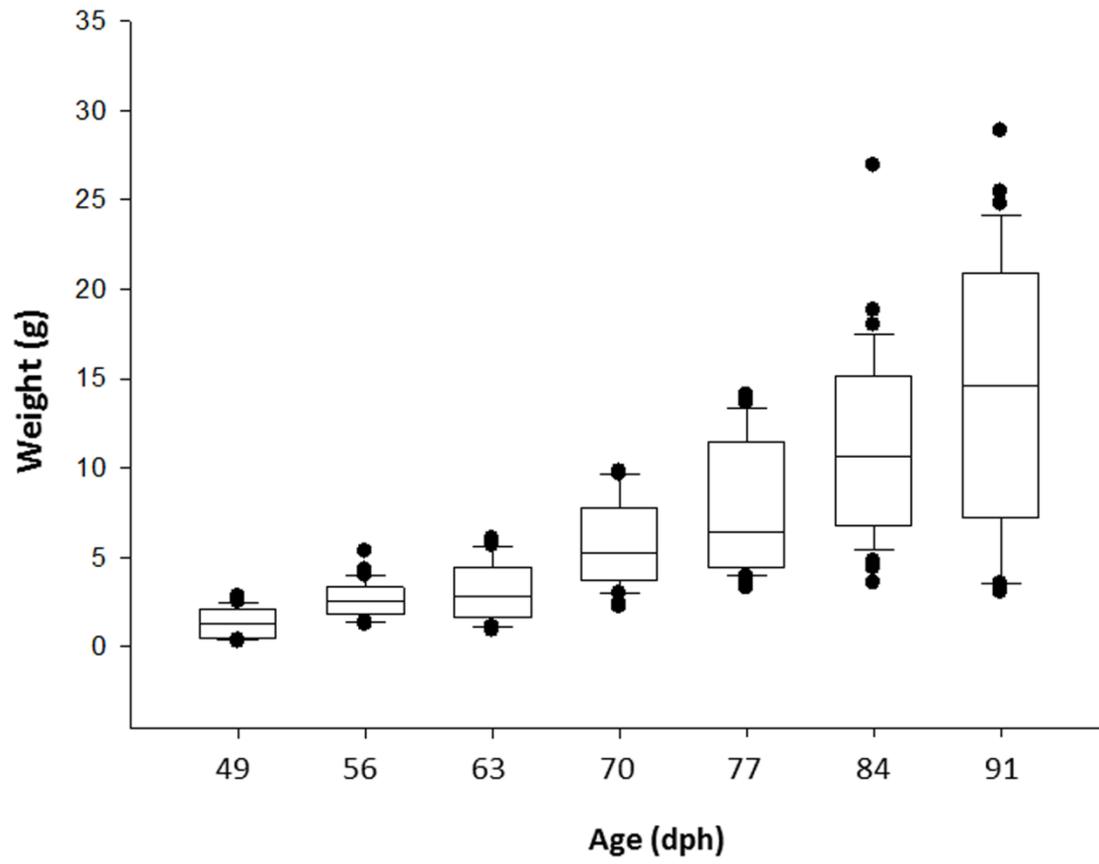
511

512

513

514 Figure 4

515



516

517

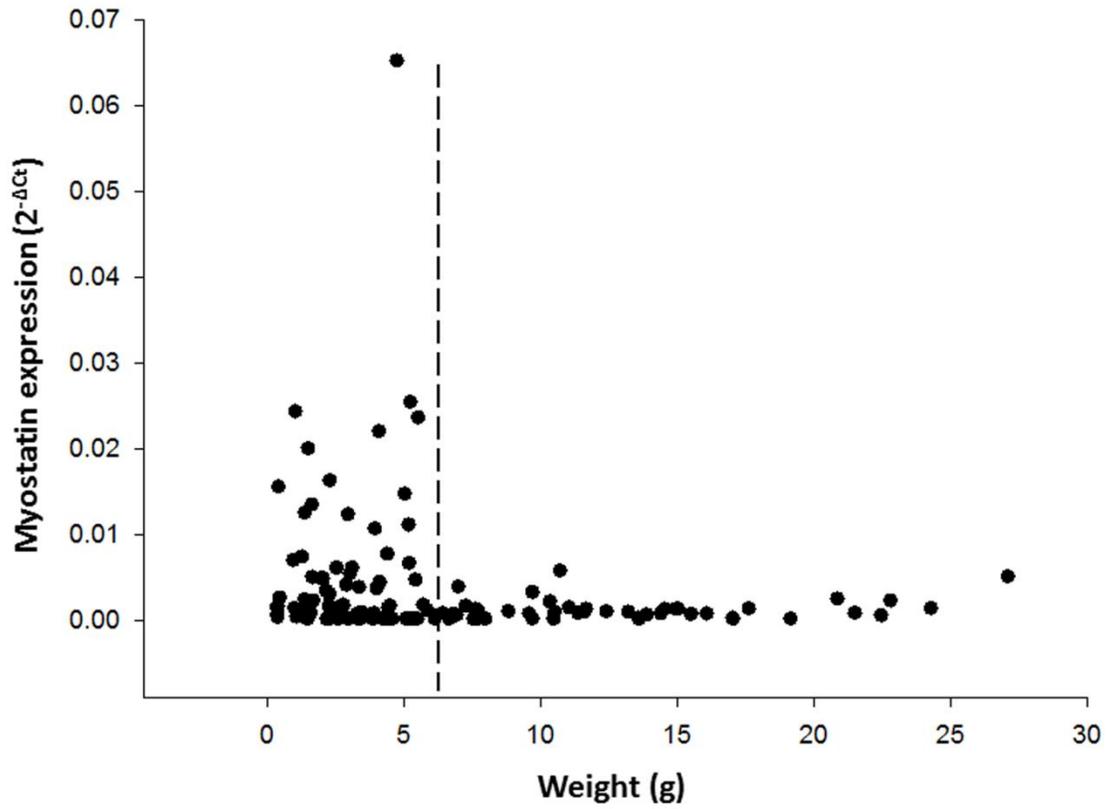
518

519

520

521 Figure 5

522



523

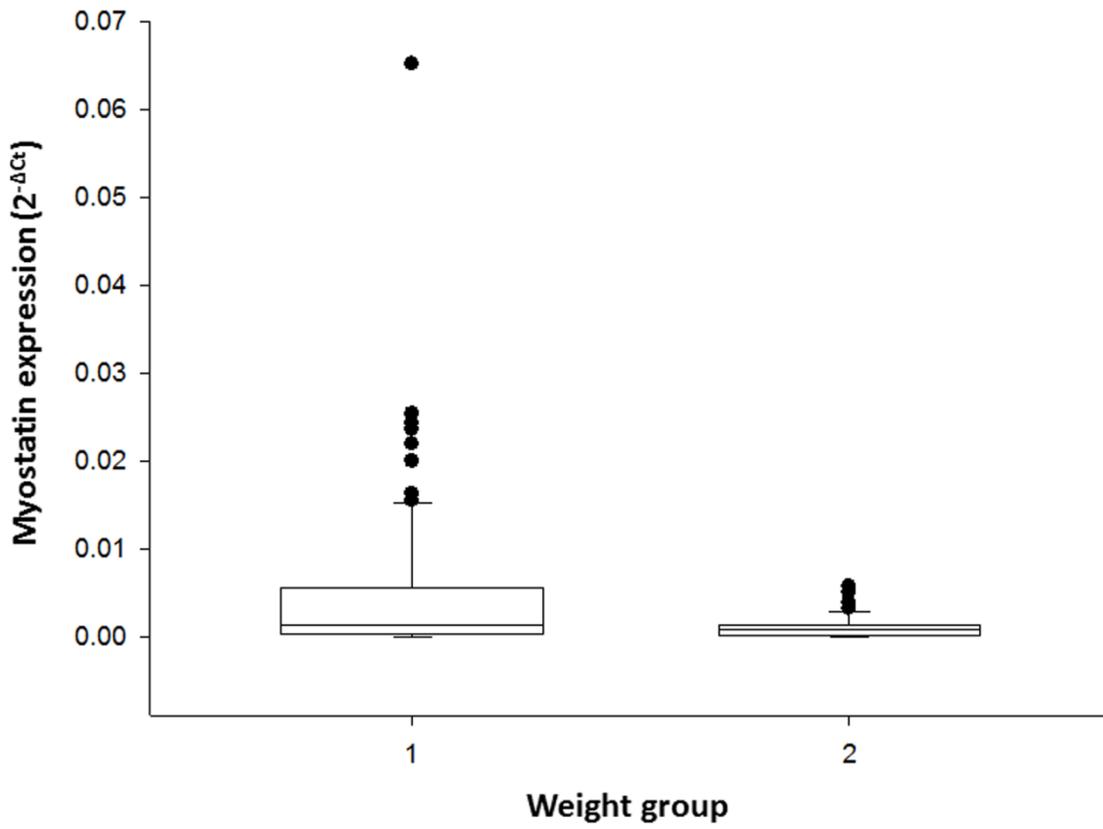
524

525

526

527 Figure 6

528



529

530

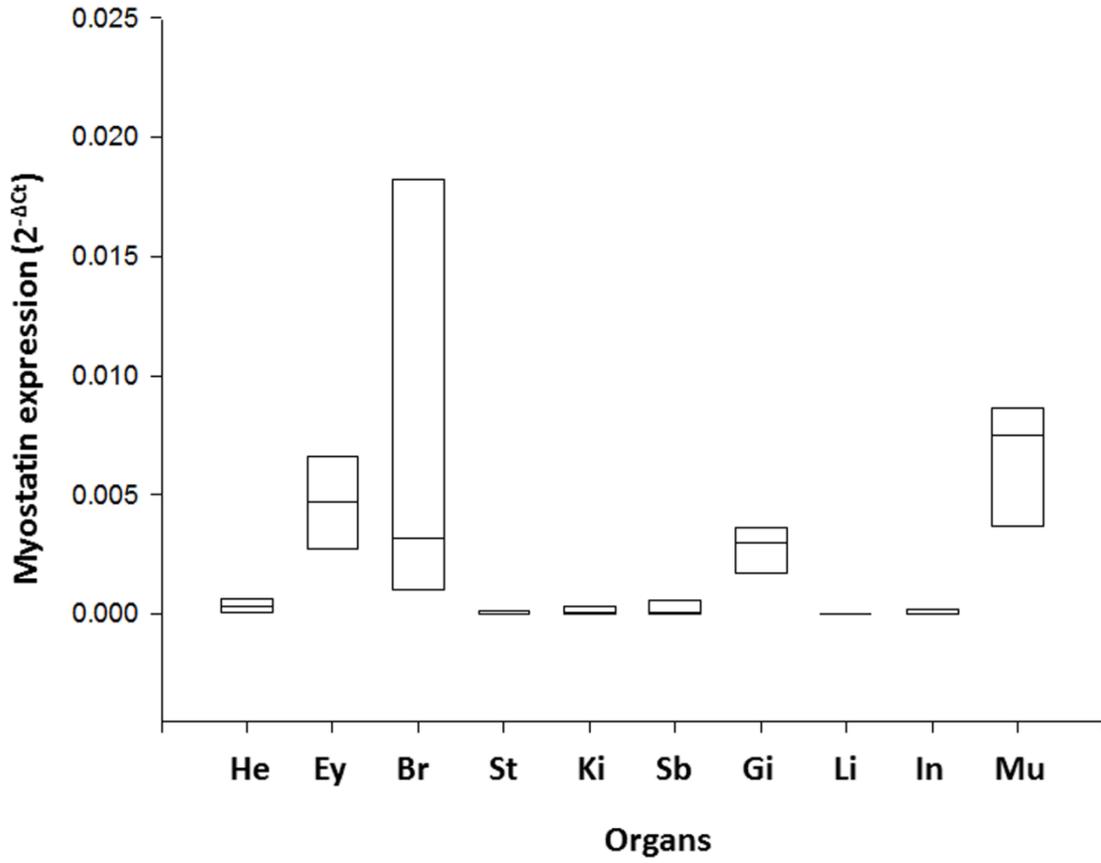
531

532

533

534 Figure 7

535



536

537