



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO DE
LA *MIOSTATINA* EN EL MÚSCULO ADUCTOR DE
*Nodipecten subnodosus***

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Acuicultura)

Presenta

Mayra Guadalupe Fuente Gómez

La Paz, Baja California Sur, Julio 2016

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 9 horas del día 20 del Mes de Junio del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Evaluación del silenciamiento génico de la *Miostatina* en el músculo aductor de *Nodipecten subnodosus*"

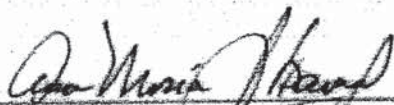
Presentada por la alumna:

Mayra Guadalupe Fuente Gómez

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

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

LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Ana María Ibarra Humphrias
Directora de Tesis



Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Co-Tutor



Dr. Raúl Antonio Llera Herrera
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Ana María Ibarra Humphries (Directora de Tesis)

Dra. Silvia Alejandra García Gasca (Cotutora)

Dr. Raúl Antonio Llera Herrera (Cotutor)

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dra. Ana María Ibarra Humphries

Dra. Silvia Alejandra García Gasca

Dr. Raúl Antonio Llera Herrera

JURADO DE EXÁMEN

Dra. Ana María Ibarra Humphries

Dra. Silvia Alejandra García Gasca

Dr. Raúl Antonio Llera Herrera

Dra. Cristina Escobedo Fregoso (Suplente)

RESUMEN

La almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* es un molusco pectínido de importancia comercial en el estado de Baja California Sur debido a su demanda y alto valor comercial ya que su mercado es principalmente para exportación. Esta especie se caracteriza por poseer un músculo aductor grande, de interés gastronómico por su sabor. Durante el crecimiento del músculo en vertebrados participan diferentes genes en su regulación; uno de estos es la MIOSTATINA, la cual es un potente regulador negativo de la masa muscular esquelética. El estudio de este gen ha interesado a diversos campos de la ciencia, desde ciencias pecuarias hasta ciencias médicas, lo cual ha resultado en que se ha estudiado en un gran número de especies de vertebrados. En el caso de invertebrados, particularmente pectínidos, el gen ortólogo de la *miostatina* (*mstn*) de vertebrados se ha caracterizado en *Argopecten irradians*, *Chlamys farreri*, *Patinopecten yessoensis*, *A. purpuratus* y recientemente en *Nodipecten subnodosus*. El silenciamiento génico a través del desencadenamiento del proceso de ARN de interferencia es una de las estrategias utilizadas para determinar la función de un gen. Recientemente en moluscos esta estrategia es utilizada para conocer la función de diferentes genes de interés para la acuicultura y genes involucrados en la inmunidad de los huéspedes intermediarios de la esquistosomiasis. Sin embargo, son pocos los estudios realizados en moluscos utilizando el ARN de interferencia y aún se encuentra en proceso el descubrimiento de todos los componentes de la maquinaria del silenciamiento génico en moluscos. En el presente trabajo se evaluó la doble cadena de ARN (dsRNA) para silenciar el ARN mensajero de la *mstn*. Se diseñó un experimento con una duración de 30 días para el silenciamiento del transcrito de la *mstn* a través de dsRNA, y en forma paralela evaluar la activación del mecanismo de interferencia por dsRNA usando el gen vital que codifica para la enzima GAPDH, *gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa* (*gapdh*), además de utilizar un control negativo inyectando dsRNA de un gen no presente en el genoma de *N. subnodosus* el cual fue el gen mejorado de la *proteína verde fluorescente* (*egfp*, *enhanced green fluorescent protein*) para evaluar la introducción de dsRNA sin inducir efectos deletéreos o mortalidades. Se inyectó los días 0, 6 y 13 del experimento en el músculo aductor una de tres concentraciones de dsRNA del transcrito de la *mstn* (0, 5, y 30 μg) del transcrito de *gapdh* (0, 20 y 60 μg) o del transcrito de *egfp* (0, 20 y 60 μg), aplicando en todos los casos inmediatamente post-inyección impulsos eléctricos directamente sobre el músculo aductor. Se realizaron muestreos de organismos cinco veces durante el experimento (los días 3, 9, 15, 21 y 30). Se analizaron las variables biométricas (peso biomasa, peso músculo y peso gónada) de los organismos y las mortalidades que se presentaron a lo largo del experimento en los diferentes tratamientos, donde se observó un incremento en biomasa y peso de gónada y no se observó un incremento significativo en peso muscular, el cual se sugiere sea evaluado a futuro utilizando tiempos experimentales más largos. Se determinó la expresión relativa de la *mstn* y de *gapdh* por PCR cuantitativo usando oligonucleótidos externos a la dsRNA; los valores obtenidos fueron normalizados y se realizaron análisis de varianza de dos vías, encontrando diferencias significativas únicamente entre días experimentales, pero no se observaron diferencias significativas en expresión de la *mstn* o de *gapdh* entre las diferentes concentraciones evaluadas en cada caso. Debido a que se sabe que la expresión de la *mstn* en músculo aductor incrementa durante la gametogénesis en esta especie y que se observó

un incremento en el peso gonadal durante el tiempo experimental, se realizó un análisis de covarianza buscando corregir por el posible impacto que la maduración gonádica pudiese haber tenido sobre la expresión de la *mstn* y *gapdh*, introduciendo como covariable el peso de la gónada de cada individuo cuya expresión relativa fue estimada. Al introducir el peso de la gónada como covariable en la expresión relativa de *gapdh*, indicó que esta era significativa y al considerar ese crecimiento gonadal en el análisis se logró un ajuste de los valores de expresión. Se encontraron adicionalmente a las diferencias significativas entre días experimentales, diferencias significativas entre concentraciones del grupo control (0 μg dsRNA) y la expresión relativa de los grupos inyectados con la dsRNA (20 y 60 μg dsRNA-*gapdh*), con los dos últimos presentando una expresión significativamente menor que la del grupo control como sería esperado de una interferencia exitosa. En el caso de la *mstn* al introducir el peso de la gónada como covariable, se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de la expresión relativa, donde los organismos inyectados solamente con solución salina (0 μg dsRNA) presentaron una expresión significativamente mayor que la expresión estimada para las concentraciones inyectadas de 5 y 30 μg dsRNA-*mstn*. En el caso de la dsRNA-*egfp*, se deberá reducir la dosis y/o evaluar otro gen como control negativo, ya que *egfp* causó efectos deletéreos en la dosis mayor. Adicionalmente se tomaron muestras de todo el músculo aductor durante los días 3 y 30 del experimento de dsRNA-*mstn*, para determinar si se presentó hipertrofia e hiperplasia entre los días experimentales. Se determinó el diámetro promedio de las fibras en cortes transversales del músculo aductor y se realizó un conteo total de fibras por el área total del músculo. Los análisis estadísticos para determinar si se presentó hipertrofia indicaron diferencias significativas entre días experimentales, indicando que no hubo hipertrofia ya que el tamaño de las fibras musculares al final del experimento (Md30) fue menor comparado con el del inicio del experimento (Md3). En el caso de la hiperplasia, los análisis estadísticos indican diferencias significativas entre días experimentales, observándose un incremento significativo en el número de fibras por mm^2 entre el inicio y el final del experimento (Md3 a Md30), e indicando una posible hiperplasia. Así como en la variable de crecimiento de peso muscular no se observó un incremento de este tampoco se observó una hipertrofia resultado de la interferencia de la *mstn*, posiblemente debido a que se deben evaluar tiempos experimentales de mayor duración. Es importante realizar investigaciones futuras de este gen de importancia comercial con fines de clarificar su función en el desarrollo del músculo esquelético, así como su posible involucramiento en otras funciones, ya que es conocido que en pectínidos el gen de la *miostatina* se expresa en otros tejidos.



Dra. Ana María Ibarra Humphries

ABSTRACT

The lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*, is a mollusk of commercial importance in the state of Baja California Sur due to its high demand and commercial value. This species is characterized by having a large adductor muscle that is of gastronomic interest for its taste. Among vertebrates, skeletal muscle growth is regulated by several genes, one of which is *myostatin (mstn)*. MSTN is known to be a potent negative regulator of skeletal muscle mass. This gene has been of interest in various fields of science, from animal science to medical science, which has resulted in a large number of vertebrate species being studied. In the case of invertebrates, particularly scallops, the *mstn* gene has been characterized in *Argopecten irradians*, *Chlamys farreri*, *Patinopecten yessoensis*, *A. purpuratus* and more recently in *Nodipecten subnodosus*. Gene silencing using RNA interference is widely used to study the function of a gene. Recently, in mollusks, this strategy has been used to determine the function of various genes of interest for aquaculture and genes involved in immunity of the intermediate hosts of schistosomiasis. However, there are few studies on mollusks using RNA interference and all components of the machinery of gene silencing in mollusks are still in the discovery process. In this work, a double-stranded RNA (dsRNA) was used to silence the *mstn* transcript. A 30 day experiment was designed, carrying in parallel an evaluation of the activation of the mechanism of interference by dsRNA using the vital gene *gapdh* encoding for the glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase enzyme, GAPDH. The *enhanced green fluorescent protein* gene (*egfp*) was used as a negative control to evaluate the introduction of dsRNA that would not result in deleterious effects or mortality. On days 0, 6 and 13, three concentrations of dsRNA-*mstn* (0, 5, and 30 μg), dsRNA-*gapdh* (0, 20 and 60 μg), or dsRNA-*egfp* (0, 20 and 60 μg) were injected into the adductor muscle of individual scallops. In all cases, immediately after the injection, electrical impulses were applied directly to the adductor muscle. Sampling of organisms was performed five times during the experiment (days 3, 9, 15, 21 and 30). Biometric variables (biomass, muscle weight, gonad weight) were analyzed for all organisms and mortalities occurring throughout the experiment in the different treatments were recorded. An increase in biomass and gonad weight was observed along the experiment, but there was no significant increase in muscle weight. This suggests that the experimental time needs to be longer. The relative expression levels of *mstn* and *gapdh* were determined by quantitative PCR. The values obtained were normalized using the geometric mean of two reference genes and two-way analyses of variance were performed. Significant differences between experimental days were observed, but no significant differences in expression of *mstn* or *gapdh* between the different concentrations evaluated for each gene were observed. Because it was known that the expression of *mstn* in adductor muscle increases during gametogenesis in this species, an analysis of covariance was performed to correct for the possible impact that gonadal maturation might have had on the expression of *mstn* and *gapdh*. The gonad weight was introduced as the covariate for each individual whose relative expression was estimated. Introducing the gonad weight as a covariate in the relative expression of *gapdh* showed that this covariate was significant in the ANCOVA, and its inclusion in the analysis resulted in significant differences not only between experimental days, but between concentrations, with the control group (0 μg dsRNA) having a higher relative expression than that seen for

the groups injected with the dsRNA (20 and 60 μg dsRNA-*gapdh*) as expected from a successful RNA interference. In the case of *mstn*, inclusion of gonad weight as a covariate in the analysis also resulted in a correction of the expression data finding significant differences between the control group (0 μg dsRNA) relative expression, which was significantly higher than the relative expression of both of the injected groups (concentrations of 5 and 30 μg dsRNA-*mstn*). For the case of *egfp* interference experiment, it was found that injection of dsRNA of this gene caused deleterious effects at the highest dosage evaluated indicating that in future studies another gene should be used as a negative control. Additionally, samples were taken from all adductor muscles from the dsRNA-*mstn* experiment on days 3 and 30 to determine whether there was hypertrophy and hyperplasia by the end of the experimental days. The mean diameter of fibers was obtained from adductor muscle cross-sections, and total counts of fibers held by the total muscle area were estimated. The ANOVA evaluating whether there was hypertrophy indicated significant differences between experimental days, although the results were unexpected because the size of the muscle fibers at the end of the experiment (MD30) was smaller compared to the beginning (Md3). In the case of hypertrophy, statistical analyses indicated significant differences between experimental days as well, but in this case showing an increase in the number of fibers per mm^2 between the start and the end of the experiment (Md3 to MD30), and therefore suggesting that hyperplasia did occur. Nevertheless, further work with longer experimental periods would be necessary to clarify if hypertrophy and hyperplasia result from *mstn* RNA interference. It is also important to study the impact of the dsRNA interference on other tissues than muscle to further understand the function of this gene because it is known that *myostatin* in pectinids is expressed in multiple tissues.



Dr. Ana María Ibarra-Humphries

Dedicatoria

A mis padres por su amor y cariño que siempre me han brindado, por el amor incondicional infinito que siempre me han dado en las buenas y en las malas, por enseñarme a no rendirme y salir adelante, ya que sin ustedes no sería posible ser la persona que soy, gracias. A mis hermanos por ayudarme y cuidarme en todo lo que hago. A mi familia por ser hermosa y por darme tanto amor.

A mi hermosa niña Jessica, te dedicó todo mi esfuerzo y sacrificio, porque eres el motorcito de mi vida, la que me enseñó a vivir y querer ser mejor cada día solo por estar contigo, te amo mi niña.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de maestría otorgada con número de registro 1021410070 y al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por las facilidades prestadas para el desarrollo de esta tesis. Al proyecto CONACYT-CB 179098 bajo la responsabilidad técnica de la Dra. Silvia Alejandra García Gasca del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD-Mazatlán).

A la Dra. Ana María Ibarra Humphries por todo su apoyo, enseñanzas y sobre todo PACIENCIA, por brindarme la oportunidad de colaborar con ella y adquirir una pequeña parte de todo su conocimiento, la admiro y agradezco que haya sido parte de mi formación, a pesar de todo lo que imponía para mí. Muchísimas gracias.

A la Dra. Silvia Alejandra García Gasca por el apoyo incondicional que me brindó en el desarrollo de esta tesis, siempre al pendiente para brindarme una mano con lo que necesitara, la admiro y agradezco todo lo que hizo por mí, su disposición y su amabilidad no se pagan con nada. Gracias de corazón.

Al Dr. Raúl Antonio Llera Herrera por su apoyo en la realización de esta tesis, por sus comentarios en contribución a la mejora del presente trabajo.

Al Laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola por las facilidades prestadas tanto en equipos, espacios y organismos para la realización de este trabajo.

A mi querida Rosy por todo lo que hiciste por mí, tu ayuda, paciencia y recomendaciones fueron lo que me sacó adelante, además de tu amistad que no podría describir lo que significa para mí.

Al laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR, con gran cariño a la Dra. Carmen Rodríguez Jaramillo y a la Técnico Eulalia Meza por todos esos gratos momentos de plática, por sus consejos y toda la ayuda que siempre me brindaron, estar disponibles y siempre con la convicción de ayudarme, se los agradezco de corazón.

A mis compañeros de maestría los cuales siempre la hicieron más significativa de lo que era.

Agradezco por último a mi familia porque son las personas más importantes en mi vida, gracias papa y mamá por hacerme lo que soy, gracias Jessy, Gaby y Manolo por siempre estar al tanto de mí y a mi niña Jessy, gracias por existir y gracias a Dios por regalarme lo más hermoso de mi vida.

CONTENIDO

| | Página |
|---|---------------|
| Resumen | ii |
| Abstract | iv |
| Dedicatoria | vi |
| Agradecimientos | vii |
| Contenido | viii |
| Lista de Figuras | xi |
| Lista de Tablas | xvi |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 5 |
| 2.1. El gen de la <i>miostatina</i> | 5 |
| 2.2. Silenciamiento génico | 8 |
| 2.2.1. RNA de interferencia en moluscos | 10 |
| 3. JUSTIFICACION | 15 |
| 4. HIPÓTESIS | 17 |
| 5. OBJETIVOS | 17 |
| 5.1. Objetivo general | 17 |
| 5.2. Objetivo específicos | 17 |
| 6. MATERIALES Y METODOS | 18 |
| 6.1. Síntesis de dsRNA (double stranded RNA) | 18 |
| 6.1.1. <i>Obtención del transcrito parcial de la miostatina</i> | 18 |
| 6.1.2. <i>Obtención del transcrito parcial del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa</i> | 19 |
| 6.1.2.1. <i>Diseño de cebadores</i> | 19 |
| 6.1.2.2. <i>Validación de la amplificación del transcrito parcial del gen de gapdh en Nodipecten subnodusus</i> | 22 |
| 6.1.3. <i>Obtención del transcrito parcial del gen de la proteína verde fluorescente mejorada</i> | 23 |
| 6.1.4. <i>Ligación de los transcritos de los genes de mstn y gapdh al promotor de T7</i> | 23 |
| 6.1.5. <i>Generación de moldes de transcripción sentido y antisentido</i> | 23 |
| 6.1.6. <i>Síntesis de dsRNA de mstn y gapdh y egfp</i> | 24 |
| 6.1.6.1. <i>Preparación de las soluciones para inyección del dsRNA</i> | 25 |
| 6.2. Silenciamiento génico | 25 |
| 6.2.1. <i>Experimento preliminar</i> | 25 |

| | | |
|---------|--|----|
| 6.2.1.1 | <i>Origen de los organismos</i> | 25 |
| 6.2.2 | <i>Experimento de RNAi</i> | 26 |
| 6.3 | Biometrías y seguimiento de supervivencia | 27 |
| 6.4 | Cuantificación de los niveles de expresión de <i>mstn</i> y <i>gapdh</i> por PCR en tiempo real | 27 |
| 6.4.1 | <i>Diseño de cebadores</i> | 27 |
| 6.4.2 | <i>Extracción de RNA y síntesis de DNA complementario (cDNA)</i> | 32 |
| 6.4.3 | <i>Evaluación de la estabilidad de los genes de referencia</i> | 33 |
| 6.4.4 | <i>Análisis de la expresión relativa de la <i>mstn</i> y de <i>gapdh</i> en músculo aductor de <i>Nodipecten subnodosus</i></i> | 35 |
| 6.5 | Análisis de hipertrofia e hiperplasia | 36 |
| 6.5.1 | <i>Cortes histológicos</i> | 36 |
| 6.5.2 | <i>Cuantificación del tamaño y número de fibras musculares</i> | 37 |
| 6.6 | Análisis estadísticos | 38 |
| 6.6.1 | <i>Crecimiento de los organismos interferidos</i> | 38 |
| 6.6.2 | <i>Expresión relativa de los grupos interferidos con dsRNA-<i>mstn</i> y dsRNA-<i>gapdh</i></i> | 38 |
| 7. | RESULTADOS | 40 |
| 7.1 | Análisis de las variables biométricas encontradas del inicio al final del experimento | 40 |
| | <i>Peso de la biomasa, músculo aductor y gónada en el experimento de interferencia con dsRNA del gen exógeno <i>egfp</i> utilizado como control negativo</i> | 40 |
| 7.1.1 | <i>Peso de la biomasa, músculo aductor y gónada en el experimento de interferencia con dsRNA del gen vital <i>gapdh</i> utilizado como control positivo</i> | 48 |
| 7.1.2 | <i>Peso de la biomasa, músculo aductor y gónada en el experimento de interferencia con dsRNA del gen de interés, <i>mstn</i></i> | 52 |
| 7.1.3 | Cuantificación de los transcritos de la <i>mstn</i> y <i>gapdh</i> por PCR en tiempo real en músculo aductor estriado de <i>Nodipecten subnodosus</i> durante el silenciamiento génico con dsRNA | 56 |
| 7.2 | <i>Estabilidad de los genes de referencia utilizados para la normalización de la expresión de los genes de la <i>mstn</i> y <i>gapdh</i></i> | 56 |
| 7.2.1 | <i>Evaluación del éxito de la interferencia a través de la estimación de la expresión relativa de los mRNA-<i>gapdh</i> presentes a lo largo de los días experimentales y concentraciones evaluadas de dsRNA-<i>gapdh</i></i> | 57 |
| 7.2.2 | <i>Evaluación del éxito de la interferencia del transcrito de la <i>mstn</i> a través de la estimación de la expresión relativa de los mRNA-<i>mstn</i> a lo largo de los días experimentales y concentraciones evaluadas de dsRNA-<i>mstn</i></i> | 61 |
| 7.2.3 | | |

| | | |
|-------|---|----|
| 7.3 | Análisis de hipertrofia e hiperplasia en músculo estriado de <i>N. subnodosus</i> . | 65 |
| 7.3.1 | <i>Análisis de hipertrofia en músculo estriado de N. subnodosus.</i> | 65 |
| 7.3.2 | <i>Análisis de hiperplasia en músculo estriado de N. subnodosus</i> | 68 |
| 8. | DISCUSIÓN | 71 |
| 9. | CONCLUSIONES | 77 |
| 10. | LITERATURA CITADA | 78 |
| | ANEXOS | 90 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|-----------------|--|
| Figura 1 | Transcrito del gen <i>gapdh</i> (<i>gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa</i>) de <i>Nodipecten subnodosus</i> . cDNA y proteína inferida. En sombra gris se denota la parte de la secuencia utilizada en el diseño de cebadores para obtener la doble cadena (dsRNA). Los cebadores utilizados están subrayados. 20 |
| Figura 2 | Alineamiento múltiple del gen <i>gapdh</i> (<i>gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa</i>) de diferentes especies de pectínidos utilizado para la selección de la parte de la secuencia de <i>N. subnodosus</i> a utilizar en la obtención de cebadores específicos para la producción de la dsRNA de <i>gapdh</i> de <i>Nodipecten subnodosus</i> . Especies incluidas: <i>Nodipecten subnodosus</i> _contig #c63093; <i>Azumapecten (Chlamys) farreri</i> GenBank KC573783; <i>Mizuhopecten yessoensis</i> GenBank GR867689; <i>Pecten maximus</i> GenBank DN794150. 21 |
| Figura 3 | Diagrama de experimento preliminar. 26 |
| Figura 4 | Ubicación de los cebadores internos y externos utilizados para la cuantificación de la expresión génica en la secuencia codificadora de <i>mstn</i> de <i>Nodipecten subnodosus</i> . 30 |
| Figura 5 | Ubicación de los cebadores internos y externos utilizados para la cuantificación de la expresión génica en un fragmento de la secuencia codificadora de <i>gapdh</i> de <i>Nodipecten subnodosus</i> . 31 |
| Figura 6 | Corte transversal de músculo aductor, la porción de músculo estriado (ME) dividida en cuadrantes para la toma de imágenes digitales. ML (músculo liso). 36 |
| Figura 7 | Imágenes digitalizadas del corte transversal de músculo aductor de la porción del músculo estriado. (A) Estimación del contorno de fibras musculares y (B) conteo de fibras musculares. 37 |
| Figura 8 | Análisis y medias del peso de la biomasa durante el experimento de RNAi de <i>egfp</i> hasta el día 21, e incluyendo las tres concentraciones. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar de las diferentes medias. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$). 42 |
| Figura 9 | Análisis y medias del peso de la biomasa durante el experimento de RNAi de <i>egfp</i> hasta el día 30 y sin incluir la concentración de 60 μg . Las barras verticales representan las medias por 43 |

- concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar de las diferentes medias. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra.
- Figura 10** Análisis y medias del peso del músculo durante el experimento de RNAi de *egfp* hasta el día 21, e incluyendo las tres concentraciones. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. 44
- Figura 11** Análisis y medias del peso del músculo durante el experimento de RNAi de *egfp* hasta el día 30 y sin incluir la concentración de 60 µg. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. 45
- Figura 12** Análisis y medias del peso de la gónada durante el experimento de RNAi de *egfp* hasta el día 21, e incluyendo las tres concentraciones. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$). 46
- Figura 13** Análisis y medias del peso de la gónada durante el experimento de RNAi de *egfp* hasta el día 30 y sin incluir la concentración de 60 µg. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$). 47
- Figura 14** Análisis y medias del peso de la gónada durante el experimento de RNAi de *egfp* hasta el día 30 y sin incluir la concentración de 60 µg. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$). 49
- Figura 15** Análisis y medias del peso del músculo durante el experimento de RNAi de *gapdh*. Las barras verticales representan las medias por 50

- concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra.
- Figura 16** Análisis y medias del peso de la gónada durante el experimento de RNAi de *gapdh*. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$). 51
- Figura 17** Análisis y medias del peso de la biomasa durante el experimento de RNAi de *mstn*. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$). 53
- Figura 18** Análisis y medias del peso del músculo aductor durante el experimento de RNAi de *mstn*. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. 54
- Figura 19** Análisis y medias del peso de la gónada durante el experimento de RNAi de *mstn*. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$). 55
- Figura 20** Estabilidad de los genes de referencia utilizados para la normalización de la expresión. 56
- Figura 21** Análisis de la expresión relativa de *gapdh* en músculo aductor durante el experimento de RNAi-*gapdh*. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$). 58
- Figura 22** Análisis del logaritmo de la expresión relativa de *gapdh* en músculo aductor durante el experimento de RNAi-*gapdh*. Las 59

- barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$).
- Figura 23** Análisis y medias de la expresión relativa de *gapdh* en músculo aductor durante el experimento de RNAi-*gapdh* al introducir como covariable el peso de la gónada. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento y en las medias por concentración indican diferencias significativas ($P < 0.05$). 60
- Figura 24** Análisis y medias de la expresión relativa de *mstn* en músculo aductor durante el experimento de RNAi-*mstn*. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$). 62
- Figura 25** Análisis y medias del logaritmo de la expresión relativa de la *mstn* en músculo aductor durante el experimento de RNAi-*mstn*. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$). 63
- Figura 26** Análisis y medias del logaritmo de la expresión relativa de la *mstn* en músculo aductor durante el experimento de RNAi-*mstn* al introducir como covariable el peso de la gónada. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias por concentración indican diferencias significativas ($P < 0.05$). 64
- Figura 27** Diagramas de ‘cajas con valores mínimos y extremos’ de los datos de hipertrofia. (A) Diagrama de dispersión mostrando los datos del muestreo realizado a los tres días. (B) Diagrama de dispersión 66

- mostrando los datos del muestreo realizado a los 30 días. Los cuadros pequeños representan la media de los datos; en los cuadros grandes se representa el 25-75% de los datos; los círculos representan los valores atípicos.
- Figura 28** Análisis de hipertrofia de músculo estriado de *N. subnodosus*. Las barras indican el área promedio de las fibras por concentración y las líneas su error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$). 67
- Figura 29** Diagramas de ‘cajas con valores mínimos y extremos’ de los datos de hiperplasia. (A) Diagrama de dispersión mostrando los datos del muestreo realizado a los tres días. (B) Diagrama de dispersión mostrando los datos del muestreo realizado a los 30 días. Los cuadros pequeños representan la media de los datos; en los cuadros grandes se representa el 25-75% de los datos; los círculos representan los valores atípicos y los asteriscos los datos extremos. 69
- Figura 30** Análisis de hiperplasia de músculo estriado de *N. subnodosus*, estimado a partir del número de fibras por área. Las barras indican las medias por concentración y las líneas su error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$). 70

LISTA DE TABLAS

| | Página |
|--|---------------|
| Tabla I. Secuencias de los diferentes cebadores utilizados | 19 |
| Tabla II. Tiempos de la aplicación de la dsRNA y de muestreo | 27 |
| Tabla III. Cebadores evaluados para la cuantificación génica | 29 |
| Tabla IV. Parejas de cebadores evaluados con tamaños de fragmentos esperados y su ubicación con respecto a la dsRNA. Los cebadores subrayados fueron los seleccionados para la cuantificación de la expresión relativa de cada gen. | 29 |
| Tabla V. Genes de referencia evaluados para su estabilidad y ser utilizados en la normalización de la expresión de <i>mstn</i> y <i>gapdh</i> . | 34 |
| Tabla VI. Mortalidades de los diferentes grupos experimentales | 48 |

1. INTRODUCCIÓN

El Golfo de California es el único mar interior en el Pacífico Oriental, la región más importante de pesquería en México, y uno de los sistemas marinos más vigilados por el sector de la conservación en el mundo (Lluch *et al.*, 2007). Al igual que el Golfo de California, del lado del Pacífico en la Península de Baja California tienen lugar la pesca artesanal y la acuicultura, ya que son ambientes marinos altamente productivos (Cisneros-Mata, 2010). Los pectínidos son una importante pesquería bajo explotación en el noroeste de México. La actividad comercial comenzó en los años 70s pero su producción es variable, lo cual ha servido como un impulso para la mejora de la pesca a través de la acuicultura (Félix-Pico, 2006). Los pectínidos son explotados activamente en el mundo, y normalmente como recurso, soporta alta presión de pesca; en algunos países se han hecho esfuerzos para mantener la captura dentro del máximo sustentable, lo cual ha permitido el desarrollo de técnicas de cultivo y manejo acuícola (Ponce-Díaz *et al.*, 2011).

El grupo de los moluscos pectínidos se diferencia de otros moluscos bivalvos en la presencia de un músculo aductor grande, siendo la parte principal del organismo que se comercializa. Es la característica más dominante en el cuerpo del animal y es el músculo más buscado por los gastronómicos. El éxito de su cultivo se debe a la gran aceptación y demanda gastronómica del músculo aductor a nivel mundial, y es por esta razón que el músculo es estudiado (Chantler, 2006).

La familia de los pectínidos alberga a más de 350 especies, de las cuales son muy pocas las que destacan por su importancia comercial, una de ellas es la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*, la cual tiene una amplia distribución a lo largo de la costa occidental de Baja California Sur, centro y sur del Golfo de California hasta Perú (Holguín-Quiñones y García-Domínguez, 2011). Esta especie lidera en los pectínidos explotados comercialmente; las zonas de mayor captura en Baja California Sur son en las lagunas Ojo de Liebre y Guerrero Negro donde existen bancos explotados

comercialmente mientras que en el Golfo de California solo se captura en Bahía Bacochibampo en Sonora (Ponce-Díaz *et al.*, 2011).

La almeja mano de león es la especie más grande y pesada de América tropical, su altura máxima es de 170 mm pero algunos especímenes han alcanzado longitudes de 218 mm, su peso completo es alrededor de 1400 g y su músculo aductor de 160 g. Su hábitat se puede encontrar desde la zona de mareas hasta 110 m, habita lagunas, bahías y canales profundos de más de 6 m con corrientes fuertes, el tipo de fondo donde se le puede encontrar es sustrato arenoso e incluso algunos bajos con zacatal. Es una especie hermafrodita funcional, cuyas poblaciones presentan su madurez sexual después de los 80 mm (Félix-Pico, 2006; Peña, 2001; Ponce-Díaz *et al.*, 2011), aunque dependiendo del sitio de origen de la población, la primera madurez sexual puede ocurrir desde los 50-55 mm (Maldonado-Amparo *et al.*, 2004).

Esta especie es de gran importancia comercial en el estado de Baja California Sur debido al alto precio que alcanza en el mercado y principalmente está destinado a la exportación, motivo por el cual es necesario generar conocimiento acerca de su biología, para potencialmente apoyar una administración racional. Roman *et al.* (2001) mencionan la importancia de conocer el periodo reproductivo en los pectínidos debido a que existe una relación muy clara entre la reproducción y el contenido de carne; se sabe que en los pectínidos existe un ciclo de almacenamiento y empleo de energía. El músculo aductor es uno de los órganos que almacena energía, lo cual puede afectar o generar variaciones en el rendimiento según los procesos fisiológicos ocurriendo en los organismos. En el caso de la almeja mano de león, se sabe que su periodo reproductivo es amplio, de agosto a enero, con dos picos de desove en octubre y diciembre, por lo que se recomienda su extracción en los meses de abril a julio, que es cuando el músculo aductor presenta su mejor condición (Ponce-Díaz *et al.*, 2011; Carta Nacional Pesquera DOF, 2012).

Investigaciones dirigidas a conocer la biología (crecimiento, reproducción) y genética (endogamia y estructura poblacional) de esta especie, así como para desarrollar

biotecnologías de poliploidía con fines de mejora productiva y de reducción de impactos genéticos de la acuicultura han sido realizadas en los últimos 15 años por el grupo de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola del CIBNOR (Racotta *et al.*, 2003; Maldonado-Amparo *et al.*, 2004; Racotta *et al.*, 2008; Ibarra *et al.*, 2006; Ramírez-Arce, 2009; Petersen *et al.*, 2009; Petersen *et al.*, 2008; Petersen *et al.*, 2010; Ibarra *et al.*, 2011).

A pesar de la importancia comercial de esta especie, la genética es un aspecto que se encuentra muy poco estudiado, aunque el grupo de estudio de Ibarra y colaboradores ha brindado importantes avances para conocer la genética de la especie, donde su importancia radica en utilizar este conocimiento para realizar manejos poblacionales conservando este recurso natural y así poder implementarlo en cultivos comerciales sin afectar a las poblaciones silvestres de esta especie, además de implementar tecnologías para incrementar la producción y el aprovechamiento de la especie.

Principalmente de esta especie en citogenética faltan aún estudios para determinar su cariotipo pero a la fecha se conoce su número cromosómico diploide, el cual es $2(n) 38$ (Ibarra *et al.*, 2011). Respecto a las tecnologías de poliploidía en *N. subnodosus* se ha evaluado la ventaja de los triploides, encontrándose que en condiciones estresantes, estos son superiores respecto al crecimiento en el músculo aductor debido al almacenamiento de energía, la cual no es utilizada para la reproducción reflejando la ventaja en el crecimiento (Maldonado-Amparo *et al.*, 2004; Ramírez-Arce, 2009). Por último en el estudio de genética de poblaciones, se han desarrollado marcadores moleculares tipo microsatélites (Ibarra *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2009) para el estudio de poblaciones y con ayuda de esos marcadores se determinó que existen dos poblaciones diferentes, una ubicada la laguna Ojo de Liebre y la otra distribuida a lo largo del Golfo de California (Petersen *et al.*, 2010). Esos marcadores a su vez ayudaron para el estudio de la semilla producida en laboratorio, donde se encontraron fuertes relaciones de parentesco entre la semilla producida que impactan sobre la heterocigosidad de las siguientes generaciones reduciendo su capacidad adaptativa (Petersen *et al.*, 2008), Lo anterior permite sugerir que para el mejoramiento de la

producción de semilla se aumente el número efectivo de reproductores y se evite la autofecundación al no usar desoves ‘en masa’ en la producción comercial de esta especie hermafrodita funcional (Ibarra *et al.*, 2011).

En un esfuerzo por identificar genes involucrados en la gametogénesis y especialmente aquellos controlando el ciclo celular meiótico con fines de utilizarlos en un futuro para inducir a la esterilidad en esta especie, se generaron librerías transcriptómicas de gónada inactiva y de la región masculina (Llera-Herrera *et al.*, 2013), identificando 1,153 genes con anotaciones de meiosis, espermatogénesis, diferenciación sexual y elementos transponibles. Finalmente, más recientemente el transcrito del gen de la *miostatina* de esta especie fue caracterizado y la expresión del gen evaluada durante un ciclo de crecimiento, mostrando una relación entre la expresión relativa de la *miostatina*, la gametogénesis y la disponibilidad del alimento. Esto es, se encontró que durante la gametogénesis así como durante los meses de baja disponibilidad de alimento (verano), los niveles de los transcritos de la *miostatina* aumentaron produciendo atrofia (Morelos *et al.*, 2015).

2. ANTECEDENTES

2.1 El gen de la *miostatina*

La superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) comprende más de 50 proteínas estructurales relacionadas con múltiples roles en el desarrollo embrionario y la homeostasis de los tejidos en animales adultos. La mayoría de estas proteínas están agrupadas en tres grandes grupos de subfamilias: TGF- β s, proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs del inglés Bone Morphogenetic Protein), GDFs o factores de crecimiento y diferenciación y activinas/inhibinas (Funkenstein y Olekh, 2010; McPherron *et al.*, 1997). La *miostatina* (también conocida como GDF-8, factor de crecimiento y diferenciación-8) es un miembro de la familia TGF- β que actúa como un potente regulador negativo de la masa muscular esquelética (Amirouche *et al.*, 2009).

La *miostatina* en vertebrados se expresa en el músculo esquelético de adultos, así como durante etapas tempranas de la embriogénesis. La expresión de la *miostatina* se restringe a los compartimientos del miotomo y las somitas en desarrollo, pero en etapas tardías se expresa a través del desarrollo en el linaje miogénico, y en animales adultos la *mstn* se expresa en el músculo esquelético en mamíferos (Lee y McPherron, 2001). Para determinar la función biológica de la *mstn* se construyeron líneas genéticas de ratones que no expresaban el gen, encontrando que estos ratones eran significativamente más grandes, mostraban un incremento en toda la masa muscular, los músculos pesaban de dos a tres veces más que los animales control y el incremento de masa resultó de una combinación de hipertrofia e hiperplasia en las células musculares (McPherron *et al.*, 1997).

La secuencia proteica de la Miostatina contiene todas las características de los miembros de la superfamilia TGF- β , incluyendo una secuencia señal para la secreción (RXXR), un sitio de procesamiento proteolítico y una región carboxilo-terminal que contiene el patrón conservado de nueve residuos de cisteína (Huang *et al.*, 2011). El gen de la *miostatina* en vertebrados contiene tres exones (Rodino-Klapac *et al.*, 2009), que codifican un precursor proteico de 376 aminoácidos, que incluye un propéptido en

el extremo amino-terminal seguido por una secuencia RSRR (Arg-Ser-Arg-Arg) que representa un sitio potencial de corte y un extremo carboxilo-terminal de 109 amino ácidos que da lugar a la proteína activa (Huang *et al.*, 2011). La activación de la Miostatina requiere de procesamiento proteolítico de la proteína precursora; el primer corte se da por enzimas de la familia de las furinas eliminando el péptido señal de 24 aminoácidos (Lee, 2004), el segundo ocurre en el sitio RSRR, localizado en los aminoácidos 240-243 produciendo dos fragmentos que permanecen unidos de forma no covalente: un propéptido N-terminal de 27,640 Da y un péptido C-terminal de 12,400 Da, el cual forma dímeros y posteriormente se convertirá en la proteína activa. Este complejo circula en la sangre manteniendo a la Miostatina de forma latente e impidiendo su activación. Un tercer corte en el amino ácido 76 producido por una metaloproteinasa perteneciente a la familia BMP-1/TLD (bone morphogenetic protein-1 Talloid) es requerido por último para activar a la Miostatina (Lee, 2004; Rodino-Klapac *et al.*, 2009).

En general, la expresión de la *miostatina* puede ser controlada a diferentes niveles y mediante diversos mecanismos, un ejemplo es la follistatina que puede unirse e inhibir a varias proteínas morfogenéticas del hueso (BMP, bone morphogenetic proteins) así como a la Miostatina (Lee y McPherron, 2001; Hill *et al.*, 2002). Otros ejemplos de proteínas que son capaces de unirse a la Miostatina e inhibir su actividad son GASP-1 (*G protein-coupled receptor-associated sorting protein 1*), FLRG (*follistatin related gene*), hSGT (*human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein*) y T-cap (*titin-cap protein*), las cuales se unen a la proteína madura o a la proteína junto con su propéptido que también actúa como un inhibidor (Dominique y Gérard, 2006; Hill *et al.*, 2002).

Desde que McPherron *et al.* llevaron a cabo la identificación inicial de la *miostatina* en 1997, numerosas investigaciones se han llevado a cabo en diferentes especies (Elliot *et al.*, 2012). Las investigaciones relacionadas con el gen de la *miostatina* (*mstn*) han interesado a diferentes campos de estudio, como son la medicina, fisiología, biología molecular, genética, producción y crianza de animales y también evolución molecular

(De la Rosa-Reyna *et al.*, 2006). Lo anterior ha resultado en que el gen de la *miostatina* ha sido estudiado en un gran número de especies de vertebrados (McPherron y Lee 1997). En humanos, ratas, ratones, porcinos, pavos y pollos las secuencias proteicas de la *Mstn* son idénticas en la región carboxilo-terminal de la molécula. La función de la *mstn* también parece estar altamente conservada entre vertebrados mayores. Por ejemplo, Grobet *et al.* (1997) demostraron que una mutación en el gen de la *miostatina* en el ganado Belgian Blue es responsable del fenotipo de la doble musculatura causando la hipertrofia muscular o incremento en el tamaño muscular, y esto se ha visto en varias razas de ganado y de perros, lo cual en el caso del ganado ha sido de interés para los productores de carne. Lo anterior se debe a que los animales de doble musculatura se caracterizan por un incremento en la masa muscular cercano al 20%, debido principalmente a una hiperplasia músculo-esquelética o incremento en el número de fibras musculares. Es por lo anterior que la *mstn* es considerada como un gen candidato para la mejora en la producción de carne ya que al ser un factor de regulación negativo del crecimiento muscular, determina la cantidad máxima de masa corporal para la mayoría de las especies (Bindu *et al.*, 2011; Fontanesi *et al.*, 2008).

A pesar de toda la información generada en vertebrados, en invertebrados la información existente sobre la función de la *miostatina* es escasa. En organismos marinos se ha secuenciado este gen en cangrejo (Covi *et al.*, 2008), langosta (MacLea *et al.*, 2010), camarones (De Santis *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010; Qian *et al.*, 2013), y específicamente en moluscos se ha secuenciado en los pectinidos *Argopecten irradians* (Kim *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2012), *Chlamys farreri* (Hu *et al.*, 2010), *Patinopecten yessoensis* (Kim *et al.*, 2007), *Argopecten purpuratus* (Morales-Collio *et al.*, 2014) y *Nodipecten subnodosus* (Morelos *et al.*, 2015), así como en el mejillón *Mytilus chilensis* (Núñez-Acuña y Gallardo-Escárate, 2014). Sin embargo, en moluscos no existen estudios dirigidos a conocer su función.

Por otro lado existen ya algunos estudios en otros invertebrados buscando definir si la *miostatina*, por su papel crucial en el crecimiento y mantenimiento de los músculos en vertebrados, tiene un papel similar en el crecimiento de los crustáceos. A pesar de esos

estudios, aún no queda claro su papel ya que a diferencia de su especificidad muscular en mamíferos, en crustáceos el gen ortólogo a la *mstn* de vertebrados no es una proteína específica del tejido muscular (Qian *et al.*, 2013). Se ha propuesto que el gen ortólogo de la *miostatina* de vertebrados, denominado como *gdf8/gdf11/mstn* en crustáceos, regula el crecimiento de manera positiva (esto es, al contrario que en vertebrados donde la regulación es en forma negativa) debido a que la expresión máxima de este gen se da después de la muda, que es cuando el crecimiento del animal es mayor (De Santis *et al.*, 2011; Qian *et al.*, 2013). Otro estudio que demuestra que el papel del gen ortólogo de la *miostatina* en crustáceos es diferente es el realizado por Lee *et al.* (2015), ya que estos autores encontraron valores significativamente más altos de expresión de la *miostatina* en el corazón comparado con el músculo de la región abdominal, sugiriendo como en el caso de los otros autores, que su papel principal no parece ser en el crecimiento y desarrollo del músculo. Adicionalmente, la disminución del transcrito de este gen por RNA de interferencia tuvo un efecto de alta mortalidad justo después de la muda, que corresponde con el momento de mayor expresión de este gen en camarones.

2.2 Silenciamiento génico

Los mecanismos para silenciar la expresión génica no deseada son críticos para el funcionamiento celular normal, e incluyen una variedad de ‘procesos de vigilancia’ tanto transcripcionales como post-transcripcionales. Por ejemplo, cuando el RNA se encuentra en forma de doble cadena (dsRNA, por sus siglas en inglés) desencadena uno de estos procesos de vigilancia post-transcripcional, en donde el silenciamiento génico o ‘interferencia’ implica el procesamiento o corte del dsRNA en pequeños fragmentos de aproximadamente 22 nucleótidos (siRNAs, short interfering RNAs), los cuales tendrán la función de degradar un transcrito de RNA de cadena sencilla que es complementario al siRNA (Caplen *et al.*, 2001).

El uso de RNA de interferencia (RNAi) es una de las herramientas disponibles para estudiar la función de un gen ya que sus efectos son generalmente específicos y ha sido evaluado en vertebrados, invertebrados y en plantas (Helliwell y Waterhouse, 2005). Fire *et al.* (1998) demostraron el uso de esta herramienta en inducir la interferencia

génica en *C. elegans*, lo cual sugiere que el mecanismo existe en otros invertebrados, por lo que es necesario adecuar estas herramientas para intereses específicos, particularmente en especies no modelo. El proceso mediante el cual trabaja el RNAi comparte varias características en distintos organismos y el resultado final es la degradación del RNA mensajero (mRNA) para producir el silenciamiento génico. Sin embargo, la variación observada en el silenciamiento inducido por la dsRNA sugiere que este mecanismo se adapta a las necesidades biológicas en diferentes organismos. Por ejemplo, Hannon (2002) indica que estas necesidades pueden incluir la metilación genómica para el silenciamiento transcripcional o postranscripcional, regulación de la estabilidad del mRNA, remodelación de la cromatina que es esencial en la organización y estabilidad del genoma, y también participa en la resistencia contra patógenos.

Según Kavi *et al.* (2008) en el mecanismo de RNAi, la enzima Dicer es la que inicia el proceso; esta pertenece a las ribonucleasas III, tiene un dominio ATP/RNA helicasa, un dominio PAZ responsable del reconocimiento de los nucleótidos libres en el extremo 3', dos dominios RNasa III (RIIIa y RIIIb) que constituyen el centro activo catalítico y un dominio dsRBD (double strand RNA Binding Domain). Dicer actúa sobre el dsRNA y lo fracciona en pequeñas moléculas de 21-23 nt (siRNAs). Estos siRNAs se desenrollan y la "hebra guía" (hebra antisentido) se incorpora al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC por sus siglas en inglés), y junto con la proteína Argonauta, se unen por complementariedad de bases al mRNA blanco, dirigiendo en conjunto la degradación. Las proteínas argonautas se involucran también en la degradación de la "hebra pasajera" (hebra sentido) y esta se degrada mientras sigue siendo parte del dúplex de siRNA, por lo que se les relaciona con el desenrollamiento del dúplex de siRNA.

Las estrategias para inducir silenciamiento génico por RNAi dependerán en gran medida de la duración del efecto de silenciamiento que se desea obtener y la naturaleza y características de las células, tejidos y organismos a utilizar (Sifuentes-Romero *et al.*, 2011). Por ejemplo, un método muy utilizado ha sido el RNA de doble cadena para determinar la función de genes como el de la *miostatina*. Acosta *et al.* (2005)

inyectaron a peces cebra con dos dosis de dsRNA desencadenando el proceso de RNAi y produciendo organismos de mayor talla comparados con el control, encontrando que el efecto fue dosis-dependiente. Otros trabajos con resultados similares sobre la eficiencia del RNAi con invertebrados y *miostatina* se han realizado en *Penaeus monodon* (De Santis *et al.*, 2011) y *Litopenaeus vannamei* (Lee *et al.*, 2015), así como con otro gen regulador del crecimiento gonadal (TGF- β) en *Crassostrea gigas* (Huvet *et al.*, 2011), logrando niveles de interferencia variables para el silenciamiento del gen.

En experimentos realizados con animales vivos, la introducción de la dsRNA a las células se ha logrado inyectando únicamente o aplicando una estimulación eléctrica en las fibras musculares después de una inyección intramuscular de dsRNA para promover la entrada de este a las fibras musculares. Tal estimulación, es llamada electroporación e induce a un incremento transitorio en la permeabilidad de la membrana lo que permite que material exógeno entre en las células (Gronevik *et al.*, 2005).

2.2.1 RNA de interferencia en moluscos

Los trabajos encontrados en moluscos usan el RNA de interferencia como herramienta para conocer la función de genes relacionados con inmunidad, interacción huésped-hospedero, sistema nervioso, sistema músculo esquelético, reproducción y formación de la concha. Se ha trabajado con moluscos de importancia tanto comercial como algunos involucrados en la salud humana. Algunas de las especies de moluscos estudiadas utilizando RNA de interferencia incluyen: *Biomphalaria glabrata*, *Lymnaea stagnalis*, *Aplysia kurodai*, *Nipponacmea fuscoviridis*, *Crassostrea gigas*, *Pinctada fucata*, *Pinctada martensii*, *Meretrix meretrix*, *Chlamys farreri*, *Argopecten purpuratus* y *Sepia officinalis* (Baeza García *et al.*, 2010; Hanington *et al.*, 2010; Knight *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2006; Korneev *et al.*, 2002; van Diapen *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2012; Fabioux *et al.*, 2009; Huvet *et al.*, 2011; Huvet *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2012; Jee *et al.*, 2014; Fang *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2012; Jiao *et al.*, 2012; You *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Oyanadel *et al.*, 2016; Grimaldi *et al.*, 2004).

Por ejemplo, se han realizado estudios de RNA de interferencia en moluscos en el área de inmunidad con el caracol de agua dulce *Biomphalaria glabrata* para determinar la función del gen FREP2 (proteína relacionada con la respuesta inmune ante trematodos digenéticos); se inyectó dsRNA de *frep2* dos días previo a la exposición del parásito *Schistosoma mansoni*, encontrando que los organismos mostraron una disminución significativa de *frep2* comparados con los controles, que respondieron ante la infestación del parásito aumentando sus niveles de expresión. De las dos dosis evaluadas, la más efectiva fue 5µg (77-80% de reducción en expresión) aunque mostró que el efecto era transitorio, con la mayor inhibición de la expresión a los 4 días post-exposición, regularizándose los niveles a los 10 días (Jiang *et al.*, 2006). En otro estudio con *B. glabrata* se determinó la función de la citoquina MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) utilizando dsRNA-*mif* encontrando una disminución significativa de los transcritos de *mif*, y observando que esto resultó en un incremento del número de parásitos en los caracoles (Baeza García *et al.*, 2010). Otro estudio con este caracol analizó la respuesta inmune ante *Echinostoma paraensei*, cuando se inhibe la proteína FREP3 por medio de siRNA específicos; la inhibición ocurrió a partir de las 12 h continuando hasta las 120 horas. Los grupos interferidos fueron infectados con miracidias en un 31% comparados con los controles (Hanington *et al.*, 2010). Otro estudio de respuesta inmune que demuestra el uso efectivo del RNAi fue el realizado por Jee *et al.* (2014) en el ostión *Crassostrea gigas*, estos autores usaron dsRNA del gen de la *defensina 1*, mostrando que puede no solo inhibir este gen sino también su homólogo la *defensina 2*. El efecto fue detectado a partir de las 12 h y hasta 72 h postinyección, y la inhibición no solo pudo ser apreciada en músculo aductor donde fue inyectada la dsRNA, sino también en otros tejidos indicando que el mecanismo de RNAi es sistémico, lo cual concuerda con estudios previos con este mismo organismo por Fabioux *et al.* (2009).

Otra área de interés para el estudio de las funciones de genes por dsRNA en moluscos a través de líneas celulares, aunque tales líneas son escasas. Por ejemplo, en la almeja *Meretrix meretrix*, para la cual se desarrolló la primera línea celular reportada en

moluscos bivalvos, se aplicó el sistema de interferencia con la finalidad de conocer si podía servir para análisis posteriores; la interferencia fue realizada en una línea celular de glándula digestiva interfiriendo al gen de *ferritina*, inhibiendo exitosamente en un 66% los niveles de mRNA y en un 20% los niveles de proteínas comparado con los controles, indicando de esta manera que el RNAi fue efectivo (You *et al.*, 2012). Estudios de interferencia génica por dsRNA asociados con sistema nervioso también han sido realizados en moluscos gasterópodos para los cuales ya han existido por algún tiempo cultivos celulares. Por ejemplo en *Aplysia kurodai* y *Lymnaea stagnalis* se estudió la memoria de largo plazo, un gen relacionado con el comportamiento de alimentación y un último gen involucrado en el crecimiento neuronal. Específicamente para el caso del gen *C/EBP*, el cual se encuentra involucrado en la adquisición de memoria de corto y largo plazo, Lee *et al.* (2001) estudiaron su función utilizando dsRNA en cultivos celulares neuronales, encontrando que el silenciamiento fue efectivo. En el caracol *Lymnaea stagnalis* se silenció el gen *nNOS* *in vivo* e *in vitro* demostrando la inhibición del transcrito en el sistema nervioso central, y encontrando que esto afectó el comportamiento de alimentación (Korneev *et al.*, 2002). Otro gen, en este caso involucrado en el desarrollo y crecimiento de las neuritas en *Lymnaea stagnalis*, *L-TRIM*, fue interferido inyectando dsRNA y logrando silenciar el transcrito exitosamente (>70%) e inhibir el crecimiento de las neuritas *in vitro* (van Diapen *et al.*, 2005).

La formación de la concha es también un área en la cual se han realizado diferentes análisis para conocer la función de diferentes genes involucrados en su desarrollo y crecimiento. Los resultados obtenidos mostraron una reducción en el nivel de expresión o cambios visibles en la estructura de la concha a causa de la inhibición de los genes. Por ejemplo, el gen *Pif* es un componente esencial de la matriz orgánica para obtener un crecimiento normal de la capa nacarada en la ostra perlera *P. fucata*; este gen fue interferido utilizando dsRNA con tres distintas dosis, mostrando un efecto dosis dependiente y un nivel máximo de inhibición de 60 % (Suzuki *et al.*, 2009). Este mismo gen (*Pif97*), cuya proteína está encargada de la mineralización de la calcita para la formación de la concha, fue evaluado en *C. gigas*; se utilizó siRNA y al igual que en el

estudio anterior, su efecto fue dosis dependiente con niveles de reducción de 67.6 % para la dosis más alta además de observar cambios morfológicos en la concha (Wang *et al.*, 2012). Otro estudio con la ostra perlera fue realizado por Fang *et al.* (2011) investigando la función de cinco genes obtenidos a través de librerías sustractivas y expresados en el manto. Su estudio con RNAi indicó que están involucrados en la formación de la capa nacarada, y como en estudios previos, el efecto fue dosis dependiente con niveles máximos de inhibición de 60% en las dosis más altas. Una última investigación en ostras perleras se llevó a cabo con el gen *DPR* (Dermatopointin), usando dsRNA, y logrando una inhibición del gen de 95 % en los grupos con las dosis más altas, indicando que el efecto fue dosis-dependiente; los organismos experimentales mostraron un crecimiento desordenado de la capa nacarada, infiriéndose que DPT participaba en la formación de nácar en esta ostra perlera (Jiao *et al.*, 2012). Finalmente, dentro de los estudios de genes involucrados en el desarrollo de la concha está el de Hashimoto *et al.* (2012) donde se investigaron las funciones de diferentes genes involucrados en el desarrollo de la concha y opérculo de la lapa *Nipponacmea fuscoviridis*. Se inyectó dsRNA para el gen ortólogo a *dpp* (decantaplegic/BMP2/4) de *Drosophila*, lo cual resultó en malformaciones en la concha, además de que esta fue más pequeña. Sin embargo, no se conoce cuáles fueron los niveles de inhibición de este gen ya que no cuantificaron el mRNA.

En el área de reproducción se han realizado solamente dos estudios para conocer el efecto causado por el RNA de interferencia. En el primero Fabioux *et al.* (2009) demostraron que el silenciamiento del gen *Vasa* fue eficiente en ostiones adultos de *C. gigas*. En este estudio se encontró que la introducción de la dsRNA no resultó en toxicidad para los ostiones en las dosis evaluadas y el efecto de la interferencia fue dosis-dependiente. En un estudio posterior del mismo grupo de investigación (Huvet *et al.*, 2011) realizaron un trabajo similar con el gen *ogTGF- β* , logrando altos niveles de silenciamiento (>70%) de los transcritos del gen, aunque no todos los organismos experimentales mostraron el fenotipo esperado de knockdown (área gonadal reducida, pocas células germinales y número limitado de gametos maduros).

A la fecha no se ha reportado estudio alguno sobre la interferencia por RNA de la *miostatina* en músculo aductor de pectínidos, aunque estudios asociados al desarrollo del sistema músculo esquelético han sido realizados utilizando el sistema de RNA de interferencia en el molusco cefalópodo *Sepia officinalis*; se analizaron dos genes relacionados con el crecimiento muscular, *Myo-D* y *Myf-5*, encargados del desarrollo del músculo liso y músculo estriado, respectivamente, inyectando dsRNA específico para cada gen y logrando inhibir el crecimiento de ambos músculos en experimentos separados. Mientras que no se cuantificó el nivel de expresión de los genes interferidos, se utilizaron anticuerpos contra las proteínas codificando para tales genes para validar la presencia o ausencia de las mismas (Grimaldi *et al.*, 2004).

Finalmente, en cuanto a estudios de interferencia con RNA de doble cadena específicamente en pectínidos, Wang y colaboradores (2011) realizaron un estudio utilizando RNAi en el pectínido *Chlamys farreri*, para conocer el tiempo óptimo de mayor silenciamiento post-inyección del gen *TLR* utilizando dsRNA; encontraron que el nivel de expresión empezó a disminuir a las 36 hpi (horas-post-inyección), manteniendo niveles bajos hasta las 120 hpi, pero incrementando los niveles a las 136 hpi, lo cual nos puede indicar que el silenciamiento fue logrado con éxito.

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha mencionado anteriormente que dentro de los genes más importantes involucrados en el crecimiento muscular de vertebrados se encuentra el gen de la *miostatina*, de interés comercial para la producción debido a su papel en el control del crecimiento. En estudios realizados para conocer su función en diversas especies de vertebrados a través del bloqueo o silenciamiento de su expresión ha dado como resultado los fenotipos de doble musculatura (Grobet *et al.* 1997, McPherron y Lee, 1997), razón por la cual se vuelve interesante en la producción de animales y más interesante aun, en un pectínido donde lo único que se comercializa es el músculo aductor. Esto llevó a la realización del presente trabajo, donde el objetivo fue determinar si el bloqueo del transcrito del gen de la *miostatina* podía ser logrado en el molusco pectínido almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* con fines posteriores de estudiar su función en la regulación del crecimiento muscular.

Aunque a la fecha se han reportado dos trabajos en camarones peneidos sobre el efecto del RNA de interferencia sobre la *miostatina* (De Santis *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015), no existen trabajos sobre el silenciamiento de la *miostatina* con RNAi en moluscos, lo que hace de este trabajo uno original e importante dada la importancia comercial de los moluscos pectínidos. En la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* recientemente se aisló y caracterizó el gen de la *miostatina*, evaluando su expresión durante el crecimiento hasta alcanzar la primera madurez sexual, encontrando como se mencionó antes que la expresión de la *mstn* varió en función de las condiciones ambientales y la maduración gonadal (Morelos *et al.*, 2015).

En forma general los resultados de diferentes estudios de interferencia por inyección de RNA de doble cadena en moluscos no han sido del todo consistentes como se puede ver en la introducción. Esto puede deberse a los numerosos retos que implica desencadenar el sistema de RNAi, como son las dosis óptimas para la apropiada administración, los diferentes niveles de expresión de los genes evaluados, el impacto que otras condiciones fisiológicas tiene sobre la expresión de un gen, así como la posible entrada

deficiente del dsRNA a la célula para el procesamiento y generación de la molécula efectora del silenciamiento.

Adicionalmente al gen blanco y a un control de solución salina, de los estudios en moluscos antes reportados pocos de ellos (Lee *et al.*, 2001; Korneev *et al.*, 2002, van Diapen *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2009; Baeza-García *et al.*, 2010; Hanigton *et al.*, 2010; Hashimoto *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2011; Knight *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Jiao *et al.*, 2012; You *et al.*, 2012; Jee *et al.*, 2014; Oyanadel *et al.*, 2016) han utilizado genes que no se espera existan en la especie evaluada (control negativo) así como genes cuya falta de expresión se espera sea letal (control positivo) para evaluar la presencia o ausencia de una interferencia génica como tal. Así mismo, ninguno de ellos ha utilizado un método que permita incrementar el éxito en la introducción de la dsRNA a la célula como sería el uso de la electroporación inmediatamente después de la inyección de la dsRNA, mejorando la eficiencia del silenciamiento.

4. HIPÓTESIS

El transcrito de la *miostatina* en almeja mano de león puede ser silenciado por RNA de interferencia sin inducir efectos deletéreos y mortalidades.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Conocer si el silenciamiento postranscripcional de la *miostatina* puede ser inducido utilizando RNA de doble cadena inyectado en el músculo aductor de *Nodipecten subnodosus*.

5.2 Objetivos específicos

1. Demostrar la existencia del sistema de silenciamiento génico en el molusco pectínido *Nodipecten subnodosus* a través del uso de controles positivo (*gapdh*) y negativo (*egfp*).
2. Estimar la eficiencia de bloqueo del transcrito de la *miostatina in vivo* en el molusco pectínido *Nodipecten subnodosus* mediante inyección de dsRNA-*mstn* seguido de electroporación.
3. Evaluar el efecto de la inhibición del transcrito de la *miostatina* sobre la supervivencia, el peso de la biomasa, del músculo aductor y de la gónada.
4. Evaluar el efecto de la inhibición del transcrito de la *miostatina* sobre el número y tamaño de las fibras musculares.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Síntesis de la doble cadena de RNA (dsRNA; double stranded RNA)

6.1.1. Obtención del transcrito parcial de la miostatina

El transcrito de la *miostatina* (*mstn*) utilizado para la obtención del dsRNA de *Nodipecten subnodosus* fue el caracterizado por Morelos *et al.* (2015) con número de acceso al GenBank KF471120.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Se utilizó la misma secuencia de cebadores (Tabla I) reportada por esos autores para la amplificación de un fragmento de 562 pb del transcrito de *la mstn* en el termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler, en un volumen final de 12 µl conteniendo 1X de Colorless Go Taq Flexi Buffer (Promega), 0.2 mM de dNTP mix (Promega), 2.5 mM de MgCl₂ (Promega), 0.2 µM de cebador MSTNc-F y cebador qMSTN-R, 0.25 U de Go-Taq Flexi Polymerase (Promega) y 2 µl de cDNA previamente sintetizado de tejido muscular de *Nodipecten subnodosus*. Las condiciones para la amplificación fueron de 3 min a 94 °C seguidos de 35 ciclos, cada uno de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 40 s 72 °C (desnaturalización / alineación / extensión), con una extensión final de 20 min a 72 °C. Los productos obtenidos fueron separados por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X (90 V, 30 min). Se utilizó un marcador de tamaños de 50 a 10,000 pb (DirectLoad™ Wide Range DNA Marker (Sigma-Aldrich), confirmando el tamaño esperado del amplicón de 562 pb. Para su visualización en el fotodocumentador –UV se utilizó una tinción fluorescente con GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, CA).

Tabla I. Secuencias de los diferentes cebadores utilizados.

| Nombre | Orientación con respecto al transcrito | Secuencia 5' – 3' | Tm °C |
|-------------------|--|--------------------------|-------|
| MSTNc-F | sentido | ACGAGAAATCGGAAGAAGA | 60 |
| qMSTN-R | antisentido | CAATCGCGTCAATGCTATGTT | 60 |
| T7 | sentido | GATGACTCGTAATACGACTCACTA | 60 |
| Nsub_GAPDH_F | sentido | TCCACACATGGCTGCTACAA | 61.6 |
| Nsub_GAPDH_R | antisentido | GGACACGGAAAGCCATACCA | 61.6 |
| M13-F | sentido | GTAAAACGACGACGGCCAG | 57.6 |
| M13-R | antisentido | CAGGAAACAGCTATGAC | 50.6 |
| β -actina F | sentido | CAGAGCAAGAGAGGTATCCTCACC | 66.2 |
| β -actina R | antisentido | GTTGAAGGTCTCGAACATGATCTG | 65.8 |

6.1.2. Obtención del transcrito parcial del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

6.1.2.1. Diseño de cebadores

El gen *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gapdh)* se utilizó como un control positivo para el experimento de RNAi. Para producir la doble cadena de este gen se utilizó un transcrito de 1586 pb (Fig. 1) obtenido del transcriptoma de *Nodipecten subnodosus* (datos no publicados), diseñando cebadores dentro de una región conservada y común en un alineamiento entre diferentes especies de pectínidos (Fig. 2). Para el diseño de los cebadores se utilizó el programa en línea Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007) (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>), y los cebadores obtenidos fueron evaluados por amplificación de PCR para establecer las mejores condiciones de amplificación del gen.


```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1 GCACCGCGAACCAAGACTTGTGACAGCAGTACCATTTACCAACCTCAACCAAAACACCCA 60
61 ACatgtctgaaatcaatataggaatcaatggatttggccgtattggccgtctcgtgttac 120
1 M S E I N I G I N G F G R I G R L V L R 20
121 gtgctgccctggagaaaggtatcaacgttgttgcaatcaatgatcccttcattgaattgg 180
21 A A L E K G I N V V A I N D P F I E L E 40
181 aatatatggtttacatgatgaagtacgattccacacatggctgctacaagatagtggtg 240
41 Y M V Y M M K Y D S T H G C Y K D S V D 60
241 actgtgataaaaccaacaataaaactcattgttaaaggacaaaagatctccgtcttcgcag 300
61 C D K T N N K L I V K G Q K I S V F A E 80
301 agcgtgatccaactgctattgcttgggtgcatctggtgcagtctatggttgggaatcca 360
81 R D P T A I A W G A S G A V Y V V E S T 100
361 caggtgtcttcaccacttttagagaaggctgccgctcatcagaaggagggtgccaagaagg 420
101 G V F T T L E K A A A H Q K G G A K A P 120
421 tcatcatttctgcaccatctgctgatgcacctatggttgcattgggagtgcaaccacaga 480
121 I I S A P S A D A P M F V M G V N H T K 140
481 aatatcaaagcagtatgaatattgtcagcaatgcacactcactaccaactgcttggcgc 540
141 Y Q S S M N I V S N A S C T T N C L A P 160
541 ctcttgccaagtgatcaatgataaattcggattgtggaaggtttgatgaccacagta 600
161 L A K V I N D K F G I V E G L M T T V H 180
601 atgccatcacagccacacagaagcagtggtggaccgagtggaaggactggcgtagtg 660
181 A I T A T Q K T V D G P S G K D W R S G 200
661 gtcgtggagctttccagaatatcattccatcctccacaggtgctgtaaggctgtcgcca 720
201 R G A F Q N I I P S S T G A A K A V G K 220
721 aggtcattccagaactcaatggaaaactgactggatggctttccgtgtccctgttcccg 780
221 V I P E L N G K L T G M A F R V P V P D 240
781 atgtgtctgttgtgacttaacctgcagactggaaaagggtgctagctatgatgctatca 840
241 V S V V D L T C R L E K G A S Y D A I K 260
841 aagctgccatcaaggaagcatctgaaggtgatctgaaaggattccttggctataccgagg 900
261 A A I K E A S E G D L K G F L G Y T E D 280
901 ataaagttgtgtcacaagacttctgtgggactcaaggagcagcatctttgatgctgtgtg 960
281 K V V S Q D F C G D S R S S I F D A G A 300
961 ctggaattgcactcaatgacaactttgtcaaattaatctcctggtatgacaacgagttcg 1020
301 G I A L N D N F V K L I S W Y D N E F G 320
1021 gatacagttgccgtgttgttgatctgatcaagcacatgcacagttgtgcttgaAAATGTT 1080
321 Y S C R V V D L I K H M H S C A * 336
1081 TTTGATGCTAGTAGATACGTAAACACCTGTAATATAAGAACAATAAACTGGCTGTTTCTT 1140
1141 CACTTCCTCAGTAACCCAAACTTGATTTCCTTGAAAGACTACTTGTGTATATTATACGCT 1200
1201 GCATGGATCCTTGCTGATTTGCTCAGAAATCCAGCTAATTTATTTTGTACAGTCCCTCAG 1260
1261 TTATTGTTTTTAACTGATTGGAAAACAGTCTGACTGGCTTTATTAACAAGACACAAAAA 1320
1321 TGTTTGGTTTTATCTGACATTTCTTGGTAAGCCTGGTCACTGTATCAGTCTTTTAAATC 1380
1381 TCATTTAACATTATAACTCCCATGTACAGTAAGTGCTAGGTAAAAAAGTGCTAAGTTTT 1440
1441 TTTTATTGATGTAACCTGAGATTATATATTGTTAGAAGTGTGAACACACCAGGATAGGT 1500
1501 AAAGGAAGTCTGGTGCCACGACACATGTTGGTGTATTAGTGTGAAATAAAATGGTC 1560
1561 TGTCACAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1586

```

Figura 1. Transcrito del gen *gapdh* (*gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa*) de *Nodipecten subnodosus*. cDNA y proteína inferida. En sombra gris se denota la parte de la secuencia utilizada en el diseño de cebadores para obtener la doble cadena (dsRNA). Los cebadores utilizados están subrayados.

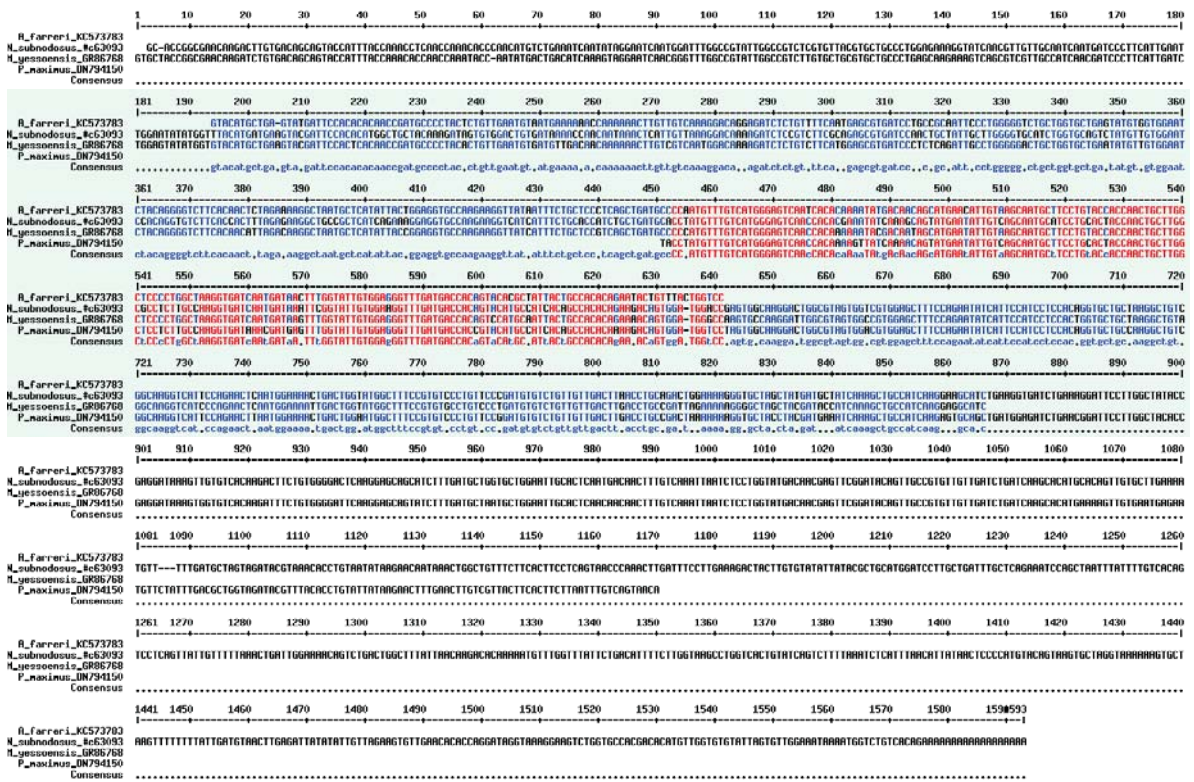


Figura 2. Alineamiento múltiple del gen *gapdh* (*gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa*) de diferentes especies de pectínidos utilizado para la selección de la parte de la secuencia de *N. subnodosus* a utilizar en la obtención de cebadores específicos para la producción de la dsRNA de *gapdh* de *Nodipecten subnodosus*. Especies incluidas: *Nodipecten subnodosus*_contig #c63093; *Azumapecten (Chlamys) farreri* GenBank KC573783; *Mizuhopecten yessoensis* GenBank GR867689; *Pecten maximus* GenBank DN794150.

6.1.2.2. Validación de la amplificación del transcrito parcial del gen *gapdh* en *Nodipecten subnodosus*

Se realizó una amplificación por PCR en el termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler para aislar el fragmento esperado con los cebadores previamente diseñados (Tabla I, Fig. 1). Se utilizó un volumen final de 12 µl conteniendo 1X de Colorless Go Taq Flexi Buffer (Promega), 0.2 mM de dNTP mix (Promega), 2.5 mM de MgCl₂ (Promega), 0.2 µM de los cebadores Nsub_GAPDH_F y Nsub_GAPDH_R, 0.25 U de Go-Taq Flexi Polymerase (Promega) y 2 µl de cDNA previamente sintetizado de tejido muscular de *Nodipecten subnodosus*. Las condiciones de la amplificación fueron de 3 min a 94 °C seguidos de 20 ciclos, cada uno de 30 s a 94 °C, 30 s a 61.6 °C y 40 s 72 °C (desnaturalización / alineación / extensión), con una extensión final de 12 min a 72 °C. Los productos obtenidos fueron separados por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X (90 V, 30 min), utilizando un marcador de tamaños 50 a 10,000 pb (DirectLoad™ Wide Range DNA Marker (Sigma-Aldrich), para confirmar el tamaño esperado del amplicón de 562 pb. Para su visualización en el fotodocumentador UV se utilizó una tinción fluorescente con GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, CA).

El fragmento amplificado (~560 pb) se ligó en el vector plasmídico pGEM-T Easy Vector (Promega) (Anexo I) para transformar bacterias quimiocompetentes *E. coli* JM109 (Promega) (Anexo II); las colonias positivas se seleccionaron y se crecieron en agar LB con ampicilina durante ~18 horas, y se realizó una extracción de DNA plasmídico con el protocolo de lisis alcalina (Anexo III). Utilizando este DNA se realizó una amplificación utilizando los cebadores M13 Forward y Reverse (Tabla I) usando las mismas concentraciones utilizadas para el aislamiento del fragmento del gen de *gapdh*. Las condiciones de la amplificación fueron: 3 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de: 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C y 40 s a 72 °C (desnaturalización / alineación / extensión), con una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos obtenidos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X; la visualización de estos productos se realizó en las condiciones mencionadas anteriormente.

Se confirmó la secuencia del inserto mediante secuenciación capilar (Sanger) a partir de un producto de PCR (50 μ l). La secuenciación se realizó en ambos sentidos por MacroGen (Corea) empleando cebadores para M13-F y M13-R. Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit v.7.2.5 y se realizó un alineamiento con la secuencia original y un análisis de similitud con otras secuencias nucleotídicas ya existentes del gen de *gapdh* con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para corroborar su similitud.

6.1.3. *Obtención del transcrito parcial del gen de la proteína verde fluorescente mejorada*

El gen de la *proteína verde fluorescente mejorada (egfp; enhanced green fluorescent protein)* se utilizó como un control negativo para el experimento de RNAi al no estar presente en el genoma de *Nodipecten subnodosus*. Para la producción de la doble cadena se utilizó un fragmento de ~600 pb obtenido de los pares de cebadores eGFP-F y eGFP-R, estos cebadores fueron diseñados con la secuencia de *egfp* junto con el promotor de T7, se realizaron amplificaciones por PCR para establecer las mejores condiciones de amplificación y proceder a la generación de moldes de transcripción.

6.1.4. *Ligación de los transcritos de los genes de mstn y gapdh al promotor de T7*

Se realizó una reacción de ligación para la unión de los productos de PCR de los transcritos de *mstn* y *gapdh* con el promotor específico T7 generando los templados para los moldes de transcripción. En un volumen total de 6 μ l se agregó 1 μ l de BLOCK-It™ T7-TOPO® Linker, 1 μ l de producto de PCR de transcrito (~20 ng/ μ l), 1 μ l de solución salina y 3 μ l de agua estéril. Se incubó la reacción en un termociclador (C1000 BioRad) a 37 °C durante 15 minutos.

6.1.5. *Generación de moldes de transcripción sentido y antisentido*

Se realizaron dos amplificaciones por separado para generar los moldes de transcripción sentido y antisentido de cada gen. Para la generación de los moldes sentido se realizaron las amplificaciones por separado de cada gen en el termociclador C1000, en un volumen final de 15 μ l conteniendo 1X de Colorless Go Taq Flexi Buffer (Promega), 0.2 mM de dNTP mix (Promega), 2.5 mM de MgCl₂ (Promega), 0.3 μ M de cebador Forward (MSTNc-F,

Nsub_GAPDH_F, eGFP_F), 0.3 μ M de cebador T7 (0.2 μ M en el caso de *egfp*) (Tabla I), 1 U de Go-Taq Flexi Polymerase (Promega) y 1 μ l del templado con el promotor T7 sintetizado en la sección anterior (en el caso de *egfp* se utilizó 1 μ l del templado, descrito en la sección 6.1.3). Los moldes antisentido se generaron con las mismas condiciones a diferencia de que los cebadores utilizados fueron los reversos (qMSTN-R, Nsub-GAPDH-R, eGFP-R). Las condiciones de amplificación fueron 3 min a 94 °C, seguidos de 26 ciclos, cada uno de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 40 s a 72 °C (desnaturalización / alineación / extensión), con una extensión final de 7 min a 72 °C. Los productos obtenidos fueron separados por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X (50 V, 120 min); se utilizó un marcador de tamaños 50 a 10,000 pb (DirectLoad™ Wide Range DNA Marker (Sigma-Aldrich), para confirmar los tamaños de ~560 pb y ~600 pb (*egfp*); la visualización de estos productos se realizó en las condiciones mencionadas anteriormente. Se cuantificaron las concentraciones de las amplificaciones utilizando el espectrofluorómetro NanoDrop 1000. Se agregaron 60 μ l de H₂O Milli Q a cada amplificación. Ambos templados se almacenaron a -20 °C.

6.1.6. Síntesis de dsRNA de *mstn*, *gapdh* y *egfp*

Para la transcripción de los moldes sentido y antisentido se utilizó el MEGAscript® RNAi Kit. Se realizó una reacción con un volumen final de 20 μ l conteniendo 1.5 μ g de cada molde sentido y antisentido de cada gen, 0.02X de buffer de reacción T7, 3.75 mM de solución de ATP, CTP, GTP y UTP, 2 μ l de mix de enzima T7 y H₂O libre de nucleasas. Se incubó en un termociclador (C1000 Touch™ Thermal Cycler) durante 6 horas. Posteriormente se incubó 5 min a 75 °C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. El RNA se alineó conforme se fue enfriando y se formó el dsRNA. Se realizó una digestión del dsRNA con nucleasas, incubando 1 h a 37 °C en un volumen final de 50 μ l conteniendo 10X buffer de digestión, DNase I y RNase. Se purificó en columnas provistas por el kit, donde se colocó el dsRNA, 0.5X binding buffer, agua libre de nucleasas y etanol 100%. Por último, el dsRNA se eluyó en la solución de elución (10 mM Tris-HCl pH7, 1 mM EDTA).

6.1.6.1. Preparación de las soluciones para inyección del dsRNA

Se cuantificó el dsRNA en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 y se prepararon soluciones de los dos dsRNA a distintas concentraciones, las cuales fueron: para *mstn* 5 y 30 µg, para *gapdh* 20 y 60 µg y para *egfp* 20 y 60 µg; estas fueron diluidas en solución salina (25 ppm) en un volumen de 100 µl para la inyección.

6.2. Silenciamiento génico

6.2.1. Experimento preliminar

6.2.1.1. Origen de los organismos

Se trajeron organismos juveniles (~5 cm) del Estero de Rancho Bueno en Bahía Magdalena, B.C.S. Estos se acondicionaron en el Laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola del CIBNOR durante 15 días alimentándolos con una dieta de mantenimiento que consiste en una relación 1:1 de las microalgas *Tisochrysis lutea* (antes *Isochrysis galbana*) y *Chaetoceros calcitrans* (1×10^9 células/organismo/día) a una temperatura de 19 °C.

Antes de la inyección de la doble cadena se evaluó un anestésico, así como el efecto de administrarles shocks eléctricos posteriormente a inyectarles solución salina. Los organismos se anestesiaron usando una solución de MgCl₂ (50 g/L H₂O marina) (Huvet *et al.*, 2011) y una vez anestesiados se hicieron dos grupos de 5 organismos cada uno. El primer grupo consistió en aplicársele un pulso eléctrico (5 pulsos de 50 V, duración de 50 milisegundos (ms), 100 ms entre cada voltaje) con un generador de pulsos eléctricos (ECM 830, BTX) directamente en el músculo con ayuda de unas pinzas provistas con electrodos de 5 mm (BTX, Tweezertrodes, 45-0489), las cuales sujetaban todo el músculo aductor. El segundo grupo consistió en inyectar lentamente en el músculo 100 µl de solución salina con una jeringa de 1 ml para insulina, y 30 s después se le aplicó un pulso eléctrico con las mismas condiciones del primer grupo. A ambos grupos se les dio un seguimiento de supervivencia diario durante 15 días, no observándose mortalidades.

6.2.2. Experimento de RNAi

Una vez aclimatados los organismos y normalizadas las condiciones de pulsos eléctricos e inyección se procedió a colocar a los organismos en 7 grupos (cada uno con 32 individuos) para los distintos tratamientos; esto se hizo con el fin de que se muestrearan 6 organismos en cada uno de 5 muestreos programados y aun tener dos individuos extras en caso de mortalidades. Los grupos fueron: dsRNA-*mstn* 5 μ g, dsRNA-*mstn* 30 μ g, dsRNA-*gapdh* 20 μ g, dsRNA-*gapdh* 60 μ g, dsRNA-*egfp* 20 μ g, dsRNA-*egfp* 60 μ g y un grupo control (0 μ g) al cual se le inyectó 100 μ l de solución salina en el músculo.

La duración del experimento fue de 30 días (Tabla II), y los días de inyección de la doble cadena (dsRNA) fueron el día d0, d6 y d13, inyectando a los individuos del grupo de *mstn* (5 y 30 μ g) y grupo control de solución salina en el músculo directamente, mientras que en los controles positivos y negativos (*gapdh* y *egfp* 20 y 60 μ g) se inyectaron de cada concentración 50 μ l en músculo y 50 μ l en gónada. Se muestrearon 6 organismos los días d3, d9, d15, d21 y d30 (Fig. 3), tomando muestras de músculo estriado las cuales se almacenaron en RNA later a -20 °C hasta su posterior procesamiento. Adicionalmente se almacenó en solución Davidson tejido de músculo estriado y liso para su procesamiento histológico.

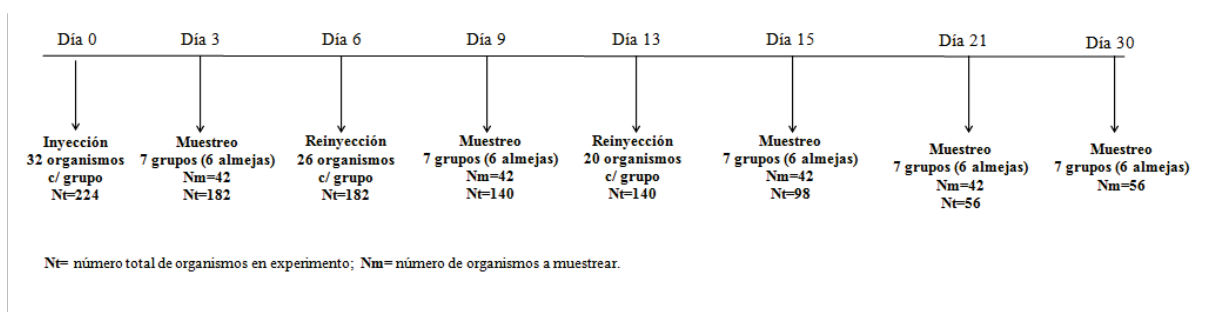


Figura 3. Diagrama de experimento preliminar.

Tabla II. Tiempos de la aplicación de la dsRNA y de muestreo.

| GEN | No. orgs | Aplicación de dsRNA | | | Tiempos de muestreos | | | | | |
|--------------------|----------|---------------------|-----|------|----------------------------------|-----|------|------|------|----------|
| | | No. Organismos | | | Numero de organismos a muestrear | | | | | |
| | | D 0 | D 6 | D 13 | D 3 | D 9 | D 15 | D 21 | D 30 | Restante |
| Solución salina | 32 | 32 | 26 | 20 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 2 |
| <i>egfp</i> 20 µg | 32 | 32 | 26 | 20 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 2 |
| <i>egfp</i> 60 µg | 32 | 32 | 26 | 20 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 2 |
| <i>gapdh</i> 20 µg | 32 | 32 | 26 | 20 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 2 |
| <i>gapdh</i> 60 µg | 32 | 32 | 26 | 20 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 2 |
| <i>mstn</i> 5 µg | 32 | 32 | 26 | 20 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 2 |
| <i>mstn</i> 30 µg | 32 | 32 | 26 | 20 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 2 |

6.3. Biometrías y seguimiento de supervivencia

Se realizaron biometrías durante los cinco muestreos realizados (d3, d9, d15, d21 y d30) evaluando para cada organismo muestreado el peso de la biomasa (peso húmedo del organismo sin concha), peso del músculo y peso de la gónada. Adicionalmente, se realizó diariamente un seguimiento de supervivencia donde se registraron todos los organismos muertos en cada uno de los experimentos.

6.4. Cuantificación de los niveles de expresión de *mstn* y *gapdh* por PCR en tiempo real

6.4.1. Diseño de cebadores

Se diseñaron cebadores específicos para la cuantificación de la expresión génica de *la mstn* y *gapdh* de *Nodipecten subnodosus*. Estos cebadores se diseñaron utilizando la secuencia obtenida del gen de la *mstn* y un contig de 1586 pb del transcriptoma de *Nodipecten*

subnodosus (#c63093) anotado como el gen de la enzima *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa* (*gapdh*), utilizando el programa Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007) (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). Tomando en cuenta que era importante excluir la parte de secuencia de la doble cadena (dsRNA) de cada gen (*mstn* y *gapdh*), se diseñaron dos pares de cebadores externos y un par de cebadores internos a la secuencia de la dsRNA del gen de la *mstn* y dos pares de cebadores internos y dos externos a la secuencia de la doble cadena (dsRNA) del gen de *gapdh*, con diferentes tamaños de fragmentos a amplificar (Tabla III y IV, Figs. 4 y 5). Estos cebadores se analizaron con el programa OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) para determinar la ausencia de dímeros o estructuras secundarias entre cebadores, además se realizaron amplificaciones de punto final con cDNA de todas las muestras resultantes del experimento con fines de escoger las parejas de cebadores internos y externos de cada gen; al igual se hicieron amplificaciones de punto final con tres gradientes concentración (0.13, 0.3 y 0.47 μM) de cebadores y así escoger la mejor concentración a utilizar. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1X de Colorless Go Taq Flexi Buffer (Promega), 0.13 μM de cebadores, 0.2 μM de dNTP mix (Promega), 2.0 μM de MgCl_2 (Promega) y 0.125 U/ μl de Go-Taq Flexi Polymerase (Promega), utilizando 5 μl de cDNA, en un volumen final de 15 μl . La amplificación se realizó en el termociclador Bio-Rad DYAD con las condiciones de amplificación siguientes: 94 °C 4 min, 30 ciclos de 94 °C 30 s, 60 °C 30 s y 72 °C (desnaturalización / alineación / extensión), con una extensión final 10 min a 72 °C. Estas amplificaciones se separaron por electroforesis en agarosa al 1% para su posterior visualización, como se mencionó anteriormente. Los cebadores seleccionados para ambos genes fueron los ubicados en la región externa de la dsRNA, para el gen de *mstn* la pareja qPCR-MSTN-F y qPCR-MSTN-R1 (externos) y para el gen de *gapdh* se utilizó qGAPDH-F3 y qGAPDH-R3a (externos). La selección de estos, se realizó con base a la eficiencia de amplificación, ausencia de dímeros y evitar que estos se cuantificaran por corresponder a una parte de la secuencia de la dsRNA.

Tabla III. Cebadores evaluados para la cuantificación génica

| Cebador | Orientación con respecto al transcrito | Secuencia 5' – 3' | T _m °C |
|-------------------|--|------------------------|-------------------|
| qMSTN-1F | Sentido | TGATGGATATGAGCCAATGC | 63.5 |
| qMSTN-1R | Antisentido | TTTGGGTGGGACTTTGTGAT | 64.1 |
| qPCR-MSTN-F | Sentido | AAACGACATCGAGTGGAAGC | 55.4 |
| qPCR-MSTN-R1 | Antisentido | ATGCTCAAATGCAATCGGAT | 52.9 |
| qPCR-MSTN-R2 | Antisentido | AATACGGACAGCCGGAAAG | 55 |
| qPCR-gapdhNsub-F1 | Sentido | TGCCATCACAGCCACACAGA | 69.4 |
| qPCR-gapdhNsub-R1 | Antisentido | GCTGTGCGCAAGGTCATTCC | 69.1 |
| qPCR-gapdhNsub-R2 | Antisentido | CTGTGCGCAAGGTCATTCCA | 57.6 |
| qGAPDH_F3 | Sentido | CTGCCATCAAGGAAGCATCTGA | 68.6 |
| qGAPDH_R3a | Antisentido | ACGAGTTCGGATACAGTTGCCG | 69.2 |
| qGAPDH_R3b | Antisentido | CTGGTGCTGGAATTGCACTCAA | 58.1 |

Tabla IV. Parejas de cebadores evaluados con tamaños de fragmentos esperados y su ubicación con respecto a la dsRNA. Los cebadores subrayados fueron los seleccionados para la cuantificación de la expresión relativa de cada gen.

| Cebador sentido | Cebador antisentido | Ubicación con respecto a la dsRNA | Tamaño del amplicón | T _m °C |
|--------------------|---------------------|-----------------------------------|---------------------|-------------------|
| qMSTN-1F | qMSTN-1R | Interna | 159 pb | 60 |
| <u>qPCR-MSTN-F</u> | <u>qPCR-MSTN-R1</u> | Externa | 156 pb | 60 |
| qPCR-MSTN-F | qPCR-MSTN-R2 | Externa | 227 pb | 60 |
| qPCR-gapdhNsub-F1 | qPCR-gapdhNsub-R1 | Interna | 129 pb | 60 |
| qPCR-gapdhNsub-F1 | qPCR-gapdhNsub-R2 | Interna | 130 pb | 60 |
| <u>qGAPDH_F3</u> | <u>qGAPDH_R3a</u> | Externa | 190 pb | 60 |
| qGAPDH_F3 | qGAPDH_R3b | Externa | 133 pb | 60 |



Figura 4. Ubicación de los cebadores internos y externos utilizados para la cuantificación de la expresión génica en la secuencia codificadora de *mstn* de *Nodipecten subnodosus*. Subrayado y negrita se indica la secuencia que corresponde a la dsRNA.

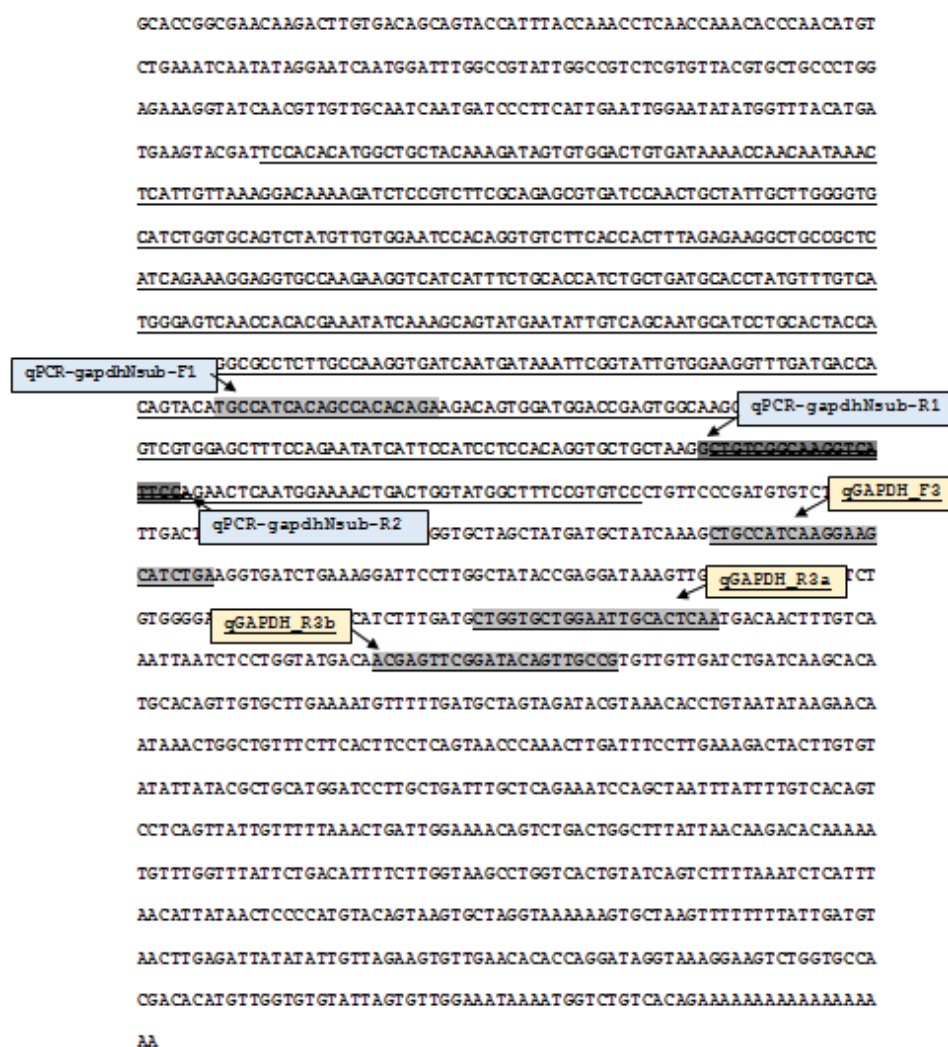


Figura 5. Ubicación de los cebadores internos y externos utilizados para la cuantificación de la expresión génica en un fragmento de la secuencia codificadora de *gapdh* de *Nodipecten subnodosus*. Subrayado y negrita se indica la secuencia que corresponde a la dsRNA.

6.4.2. Extracción de RNA y síntesis de DNA complementario (cDNA)

Se realizó la extracción de RNA total de músculo estriado de cada individuo de los grupos interferidos con las dos concentraciones (5 y 30 µg) de dsRNA de *mstn*, las dos concentraciones (20 y 60 µg) de dsRNA de *gapdh* y el grupo control (0 µg) inyectado con solución salina a lo largo de toda la duración del experimento. Se llevó a cabo la extracción con el reactivo de TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science) utilizando el protocolo provisto por el proveedor (Anexo IV). El RNA total se resuspendió en 30 µl de H₂O MilliQ, se verificó la integridad del RNA tomando 2 µl de RNA extraído en una electroforesis en agarosa al 1% con buffer TAE (60 V, 90 minutos). Se cuantificó la concentración de RNA obtenido de cada organismo en un espectrofluorómetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). Del volumen total de RNA obtenido se tomaron 7 µg para la eliminación del DNA genómico utilizando 5 U RQ1 DNase I (Promega), 1X de Buffer, y 0.5 U de RNasin (Promega) y H₂O MilliQ en un volumen final de 20 µl. Se incubaron a 37 °C por 60 min, deteniendo la reacción con 1 µl de Stop Solution (Promega) e incubando a 65 °C por 10 min (Anexo V). Para la verificación de la eliminación total de DNA genómico se realizó una amplificación por PCR con cebadores del gen de referencia *β-actina* (Llera-Herrera *et al.* 2012) (Tabla 1); la reacción de PCR se llevó a cabo utilizando un volumen de reacción de 6 µl conteniendo 1 µl de RNA, 1X de Colorless Go Taq Flexi Buffer (Promega), 0.2 mM de dNTP mix (Promega), 2.0 mM de MgCl₂ (Promega), 0.2 µM de cada cebador y 0.25 U de Go-Taq Flexi Polymerase (Promega). Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 3 min a 94 °C seguido de 40 ciclos, cada uno de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C (desnaturalización / alineación / extensión), con una extensión final de 5 min a 72 °C. La no-amplificación de los productos fue analizada por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X (30 min, 90 voltios), con un marcador de tamaños de 50 a 10,000 pb Direct Load Wide Range DNA Marker (SIGMA). Para la visualización se utilizó una tinción fluorescente con GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, CA) en el fotodocumentador-UV.

Se cuantificó la concentración final del RNA obtenido de cada organismo utilizando el espectrofluorómetro NanoDrop 1000 después de la limpieza del DNA genómico. Con las

concentraciones obtenidas, se tomaron 4 μg de RNA total de cada muestra para la síntesis del DNA complementario (cDNA) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, con el kit ImProm-IITM Reverse Transcription System (Anexo VI), se agregó Oligo (dT)₁₈ a las muestras previo a la síntesis del cDNA y se incubó 5 minutos a 70 °C (Anexo VI). Se comprobó que se hubiese realizado la síntesis de cDNA utilizando 1 μl de cada una de las muestras y se amplificó por PCR el gen de referencia *β -actina* con el protocolo previamente descrito. La visualización de los productos se realizó como se mencionó anteriormente. Después de la síntesis del DNA complementario (cDNA), este se cuantificó en el espectrofluorómetro NanoDrop 1000 y se realizaron diluciones de todas las muestras para dejarlas a una concentración de 50 ng/ μl .

6.4.3. Evaluación de la estabilidad de los genes de referencia

Para la cuantificación de la expresión de los transcritos de la *mstn* y *gapdh* en músculo aductor en los organismos interferidos con dsRNA y los organismos control, se utilizaron los genes de referencia *rpl-8* (riboproteína 18), *tub- α* (alfa-tubulina), *ef-1 α* (factor de elongación 1 alfa) y *18S* (18S-RNAr) (Tabla V) previamente utilizados tanto por Llera-Herrera *et al.* (2012) en un estudio realizado para la búsqueda de genes de referencia más estables para usar en el análisis de la expresión de genes relacionados con la gametogénesis de *Nodipecten subnodosus*, como por Morelos *et al.* (2015) en el estudio de la *mstn* en el músculo aductor en condiciones de crecimiento.

Se realizaron amplificaciones por triplicado en un termociclador de tiempo real (CFX96 TouchTM Real-Time PCR Detection System), en placas de 96 pozos cubiertas con películas adhesivas ópticas (Bio-Rad). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 15 μl , utilizando 7.5 μl de un mix con las siguientes concentraciones: 1X de Colorless Go Taq Flexi Buffer (Promega), 0.2 mM de dNTP mix (Promega), 2.5 mM de MgCl₂ (Promega), 1X de EvaGreen (Biotium, Hayward, CA), 0.45 U de Go-Taq Flexi Polymerase (Promega) y H₂O de grado de biología molecular (Sigma); adicionalmente se agregaron 5 μl de cDNA dilución 1:50 (~50 ng/ μl) y de cada pareja de cebadores de los genes de referencia a evaluar se usaron diferentes concentraciones con base en las curvas de eficiencia, las cuales fueron las siguientes: 0.16 μM para *ef-1 α* , 0.16 μM para *tub- α* y 0.46 μM para *18S*. Las

condiciones de amplificación utilizadas fueron 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C donde se realizó la lectura de la fluorescencia (desnaturalización / alineación-extensión). La curva de desnaturalización fue de 60 °C a 95 °C con un incremento de 0.5 °C por segundo. Estas curvas de disociación obtenidas fueron analizadas para la confirmación de un solo amplicón de cada gen mediante la temperatura de fusión y con base en esta poder discernir productos inespecíficos o dímeros.

Tabla V. Genes de referencia evaluados para su estabilidad y ser utilizados en la normalización de la expresión de *mstn* y *gapdh*.

| Cebador | Orientación con respecto al transcrito | Secuencia 5' – 3' | Tamaño del amplicón (pb) | Tm °C utilizada |
|--------------|--|------------------------|--------------------------|-----------------|
| <i>rpl8</i> | Sentido | CGTCATGGATACATCAAGGGT | 153 | 60 |
| | Antisentido | CAAACAGTCCAGTGTACATGCC | | |
| <i>ef-1a</i> | Sentido | GTGCCAGTGGGTAGGGTAGA | 199 | 60 |
| | Antisentido | CTCCAGCAACGTTTCCTCTC | | |
| <i>tub-a</i> | Sentido | TTCAGCCTGATGGACAAATG | 181 | 60 |
| | Antisentido | TCTGGATGAAACAGCTGACG | | |
| <i>18S</i> | Sentido | GAAATTCTTGGATCGCCGTA | 168 | 60 |
| | Antisentido | GCCGAGTCATTGAAGCAACT | | |

Para determinar la eficiencia de amplificación (E) de los genes de referencia mencionados anteriormente, se realizaron diluciones seriadas (1:5) de un *pool* donde se incluyeron todas las muestras obtenidas de cDNA en el experimento de interferencia y de los organismos control. Se estimó la pendiente en una curva estándar resultante de esas diluciones seriadas (en logaritmo) y sus Cq's. La eficiencia (E) se estimó utilizando la ecuación $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1)$ reportado por Pfaffl (2001) y recomendado por Bustin *et al.* (2009). Una vez determinada la eficiencia de los genes de referencia a utilizar se evaluó la estabilidad de su expresión. Para este fin se realizaron amplificaciones en tiempo real por triplicado de todas las muestras obtenidas a lo largo del experimento de interferencia con las concentraciones

de cebadores y condiciones de amplificación mencionadas anteriormente. Los valores de Cq obtenidos de cada una de esas tres pseudo-réplicas se promediaron y fueron utilizados para calcular la estabilidad de los genes de referencia utilizando la herramienta en línea (<http://fulxie.0fees.us/?type=reference&ckattempt=2>) RefFinder (Xie *et al.*, 2012).

6.4.4. Análisis de la expresión relativa de la *mstn* y de *gapdh* en músculo aductor de *Nodipecten subnodosus*

Se cuantificó la expresión de la *mstn* y de *gapdh* de *Nodipecten subnodosus* a través de la amplificación por qPCR utilizando los cebadores externos previamente descritos para *mstn* (qPCR-MSTN-F y qPCR-MSTN-R1) y *gapdh* (qGAPDH-F3 y qGAPDH-R3a) (Tabla IV). La amplificación se realizó como se describió en la sección 6.4.3, la concentración de los cebadores utilizada en cada reacción de qPCR fue la misma para ambos genes, de 0.13 μ M. La eficiencia de la amplificación (E) de esta pareja de cebadores fue determinada de la misma manera que se realizó con los genes de referencia. De acuerdo al modelo de cuantificación relativa recomendado por Pfaffl (2004), esta eficiencia gen-específica se utilizó en la estimación de la cantidad relativa de transcritos de cada gen evaluado (genes blanco y de referencia).

De los genes de referencia seleccionados por su estabilidad para los análisis y los genes blanco, *mstn* y *gapdh*, se obtuvieron entonces las cantidades relativas (CR) de cada gen, las cuales fueron estimadas con la ecuación $CR_i = (1+E)^{(C_{qpromedio} - C_{q_i})}$ donde CR_i = cantidad relativa de transcrito de por ejemplo la *mstn* en el organismo 'i'. Una vez obtenidas las cantidades relativas para cada uno de los genes blanco (*mstn* y *gapdh*), así como para cada uno de los genes de referencia se determinaron los valores de expresión relativa (ER) de la *mstn* y de *gapdh*, los cuales fueron calculados como la proporción de las cantidades relativas (CR) de cada gen en un organismo utilizando la siguiente ecuación: $ER = CR_t/CR_{nf}$ (t = gen blanco o 'target' = *mstn* o *gapdh*; y nf = factor de normalización, el cual es obtenido a partir de la media geométrica de los genes de referencia seleccionados como más estables) (Hellemans *et al.*, 2007).

6.5. Análisis de hipertrofia e hiperplasia

6.5.1. Cortes histológicos

Las muestras de músculo aductor de *Nodipecten subnodosus* fueron preservadas y procesadas histológicamente de acuerdo a la técnica histológica convencional (Humason, 1979). Se realizaron cortes de 4 μm con un micrótomo rotatorio (Leica RM2155, Leica Microsystems) que fueron montados en laminillas de vidrio y teñidas con tinción hematoxilina-eosina en un teñidor automático (ST5010 Autostainer XL de Leica). Se digitalizaron aleatoriamente 8 imágenes de cada organismo (laminilla) con el objetivo 100X, cada una dentro un cuadrante delimitado en el músculo estriado (2 imágenes por cuadrante) (Fig. 6). Se utilizó un microscopio óptico de contraste de fases (Olympus BX50) y una cámara digital (CoolSNAP Pro, MediaCybernetics, Inc.) y el programa Image Pro Plus v. 6.0 (Media Cybernetics, Inc.). El total de imágenes que se digitalizaron fue de 312, las cuales provinieron del día 3 (d.3: 48 imágenes de cada uno de los grupos de solución salina, 5 μg y 30 μg y del día 30 (d.30: 64 imágenes del grupo de solución salina, 64 imágenes del grupo de 5 μg y 40 imágenes del grupo de 30 μg).

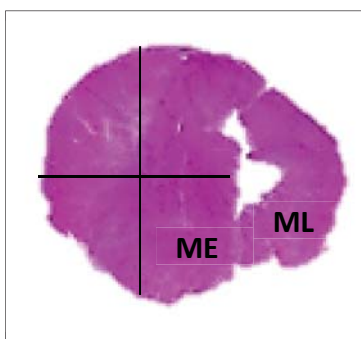


Figura 6. Corte transversal de músculo aductor, la porción de músculo estriado (ME) dividida en cuadrantes para la toma de imágenes digitales. ML (músculo liso).

6.5.2. Cuantificación del tamaño y número de fibras musculares

Con el programa Image Pro Plus v. 6.0 se realizó una medición del contorno de las fibras musculares de las imágenes digitalizadas de los grupos seleccionados, de cada imagen se seleccionaron 25 fibras con un total de 200 fibras medidas por laminilla de acuerdo a la división por cuadrantes que se mencionó en la sección anterior (Sección 6.5.1) (Fig. 7A). El número de fibras musculares se estimó en las 8 imágenes digitalizadas aleatoriamente por individuo, cada una con un área de $3221.08 \mu\text{m}^2$ utilizando el programa Image Pro Plus donde se contaron todas las fibras por imagen (Fig. 7B). El número de fibras por mm^2 fue estimado usando la siguiente relación: número de fibras / 0.00322108 . El área total del músculo fue estimada escaneando las laminillas y midiendo dos diámetros (horizontal y vertical), obteniendo el diámetro promedio del músculo y su área por cada individuo. Esta medida del área muscular fue realizada con el propósito de obtener un estimado para el número total de fibras musculares por sección cortada utilizando la siguiente relación: (Número total de fibras por sección cortada del músculo = número de fibras por mm^2 x área muscular).

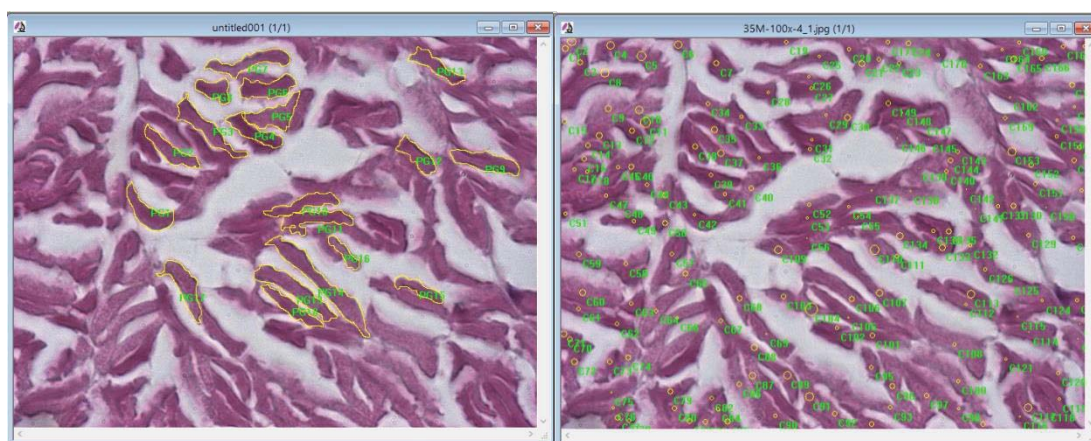


Figura 7. Imágenes digitalizadas del corte transversal de músculo aductor de la porción del músculo estriado. (A) Estimación del contorno de fibras musculares y (B) conteo de fibras musculares.

6.6. Análisis estadísticos

6.6.1 *Crecimiento de los organismos interferidos*

Se analizó el incremento en biomasa (peso húmedo del organismo sin concha), peso del músculo aductor y peso de la gónada durante la etapa experimental utilizando los datos biométricos iniciales, intermedios y finales de esas variables en un análisis de varianza de dos vías con interacción, incluyendo los factores ‘días experimentales’ y ‘concentración’ inyectada.

6.6.2 *Expresión relativa de los grupos interferidos con dsRNA-mstn y dsRNA-gapdh*

Se evaluó el éxito de la interferencia de los genes *mstn* y *gapdh* utilizando en primera instancia la variable de expresión relativa (ER) y el mismo modelo de ANOVA que se utilizó para analizar el crecimiento, evaluando si existieron efectos de los factores ‘concentración’ y ‘días experimentales’ así como de su interacción.

Adicionalmente se evaluó la ER transformada a logaritmos con el fin de conocer si la falta de normalidad en los datos estaba afectando los análisis y sus resultados.

Finalmente, y debido a que se sabía que la expresión de la *mstn* en músculo aductor incrementa significativamente durante la gametogénesis en esta especie (Morelos *et al.*, 2015), se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) buscando corregir por el posible impacto que la maduración gonádica (crecimiento gonadal) pudiese haber tenido sobre la expresión de la *mstn* y *gapdh*, introduciendo como covariable el peso de la gónada de cada individuo cuya ER fue estimada. El uso de covariables con fines de corregir efectos que no son claros o directamente visibles (*confounded*) pero que afectan a la variable de respuesta (variable dependiente) cuando se presentan es común e importante en la investigación científica (Badii *et al.*, 2008).

6.6.3 *Análisis de cuantificación del tamaño y número de fibras musculares*

Se analizaron los datos del tamaño y número de fibras musculares, realizando un análisis preliminar exploratorio tipo ‘cajas con bigotes’ para mostrar la dispersión de los datos. Se determinaron los datos atípicos como aquellos que se encontraban 1.5 veces fuera del rango

de la mediana de los datos; los datos extremos se consideraron como aquellos que se encontraban 3 veces fuera del rango de la mediana (Levine *et al.*, 2006). Los datos atípicos y extremos fueron eliminados y se procedió a utilizar el mismo modelo de ANOVA usado para analizar el crecimiento, evaluando si existían efectos causados por los factores ‘concentración’ y ‘días experimentales’ así como de su interacción.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de las variables biométricas encontradas del inicio al final del experimento

7.1.1 *Peso de la biomasa, músculo aductor y gónada en el experimento de interferencia con dsRNA del gen exógeno egfp utilizado como control negativo*

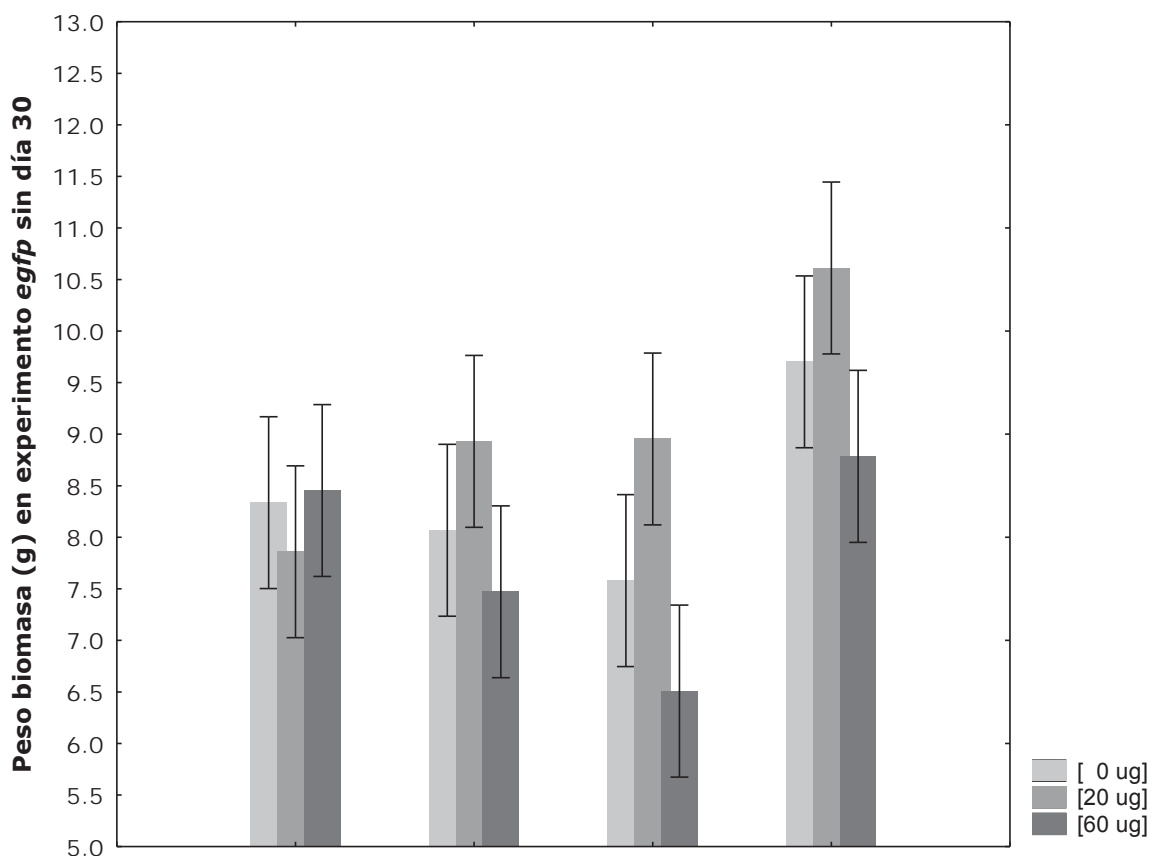
Se realizaron dos análisis de las variables biométricas solo en el caso de este gen ya que no se encontraron organismos vivos en la concentración más alta el día 30, esto es, al final del experimento: en el primer análisis se incluyeron los datos biométricos de los organismos en las tres concentraciones hasta el día 21, que fue cuando aún había organismos en todas ellas, y en el segundo análisis se utilizaron solo los datos biométricos de los organismos en el grupo control (0 μg) y en la concentración de 20 μg hasta el día 30 del experimento.

En el primer análisis con las 3 concentraciones hasta el día 21, se encontró que el peso de la biomasa incrementó significativamente a los 21 días experimentales para los organismos donde se utilizó como control negativo el gen exógeno *egfp* tanto a la concentración 0 μg como a la concentración 20 μg (Fig. 8). Se puede observar un posible efecto negativo en la mayor concentración utilizada (60 μg) a los 15 días, ya que, aunque no se encontraron diferencias significativas, se observó un decremento en la biomasa promedio de los organismos inyectados con esta concentración de dsRNA. Adicionalmente, como se mencionó antes, la mortalidad en este grupo para el día 30 del experimento fue total (Tabla VI). En el segundo análisis dejando fuera la concentración de 60 μg y evaluando hasta el día 30, se observa un incremento en la biomasa el día 21 para luego disminuir ligeramente el día 30 (Fig. 9).

Por otro lado, a diferencia de la biomasa que incrementó a lo largo del experimento, el peso del músculo aductor no mostró cambios significativos, así como tampoco un patrón directamente asociado con las concentraciones inyectadas de dsRNA-*egfp*. Esto es, aunque se puede observar que los pesos del músculo aductor de las concentraciones de 0 y 60 μg en el día 15 tuvieron una disminución notable comparado con el grupo de 20 μg (Figs. 10 y 11), el peso del músculo del grupo interferido con la mayor concentración (60 μg) mostró

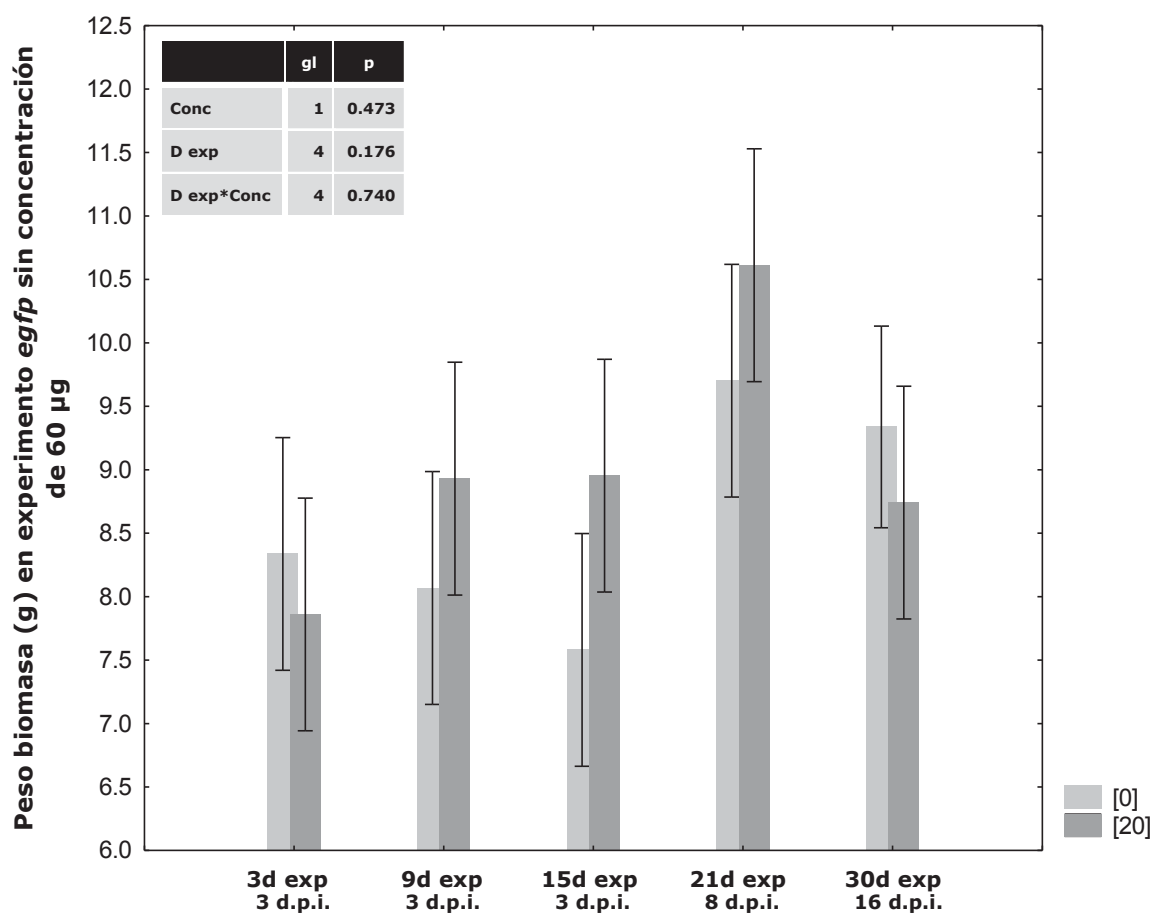
una tendencia a ser el menor en el promedio de los días experimentales, similarmente a lo observado en el caso de la biomasa.

Finalmente, al igual que el peso de la biomasa, tanto en el primer como segundo análisis evaluando las tres concentraciones hasta el día 21 o las concentraciones de 0 y 20 μg hasta el día 30, el peso de la gónada mostró diferencias significativas entre el inicio y final del experimento, incrementando significativamente para el día 21 (Fig. 12) y 30 (Fig. 13). Por otro lado, aunque no se observaron diferencias significativas en peso de gónada entre las tres concentraciones evaluadas, se puede observar nuevamente una tendencia para presentar un menor peso de gónada en los organismos inyectados con la mayor concentración (60 μg dsRNA-*egfp*, Fig. 12).



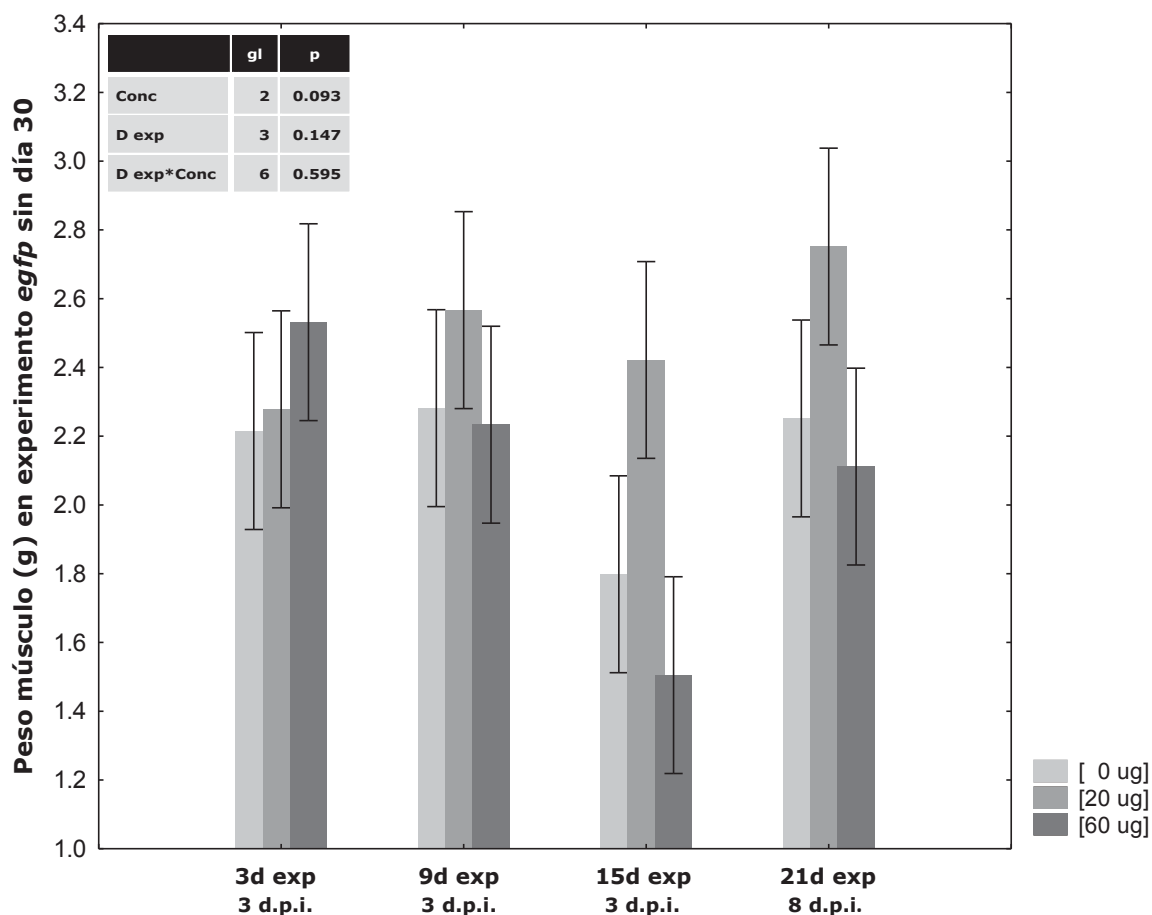
| Concentración | d3 | d9 | d15 | d21 | Medias por concentración |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------|
| 0 μg | 8.336 ₍₆₎ | 8.068 ₍₆₎ | 7.580 ₍₆₎ | 9.701 ₍₆₎ | 8.421 |
| 20 μg | 7.860 ₍₆₎ | 8.930 ₍₆₎ | 8.953 ₍₆₎ | 10.611 ₍₆₎ | 9.088 |
| 60 μg | 8.453 ₍₆₎ | 7.471 ₍₆₎ | 6.508 ₍₆₎ | 8.785 ₍₆₎ | 7.804 |
| Medias a lo largo del experimento | 8.216 ^A | 8.156 ^A | 7.680 ^A | 9.699 ^B | |

Figura 8. Análisis y medias del peso de la biomasa durante el experimento de RNAi de *egfp* hasta el día 21, e incluyendo las tres concentraciones. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar de las diferentes medias. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$).



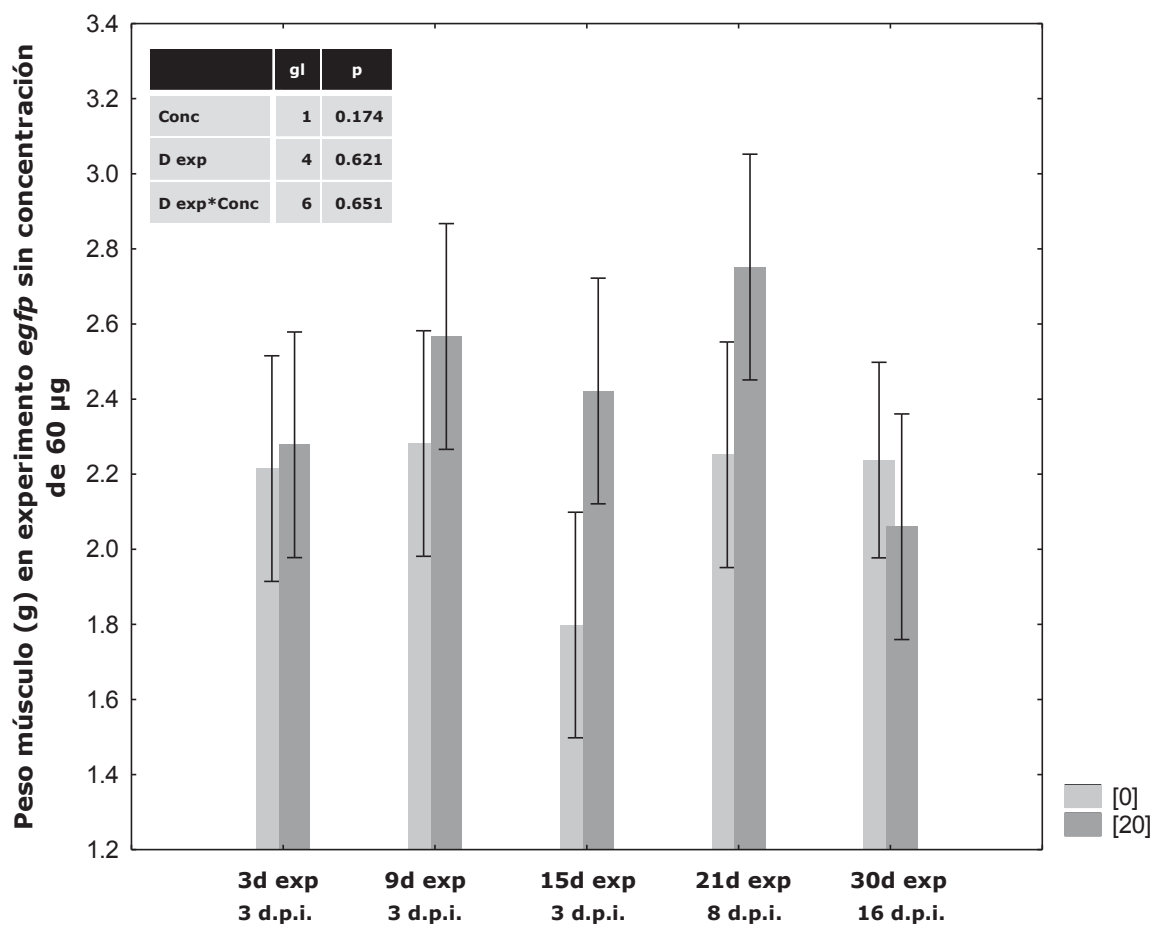
| Concentración | d3 | d9 | d15 | d21 | d30 | Media por concentración |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|
| 0 µg | 8.336 ₍₆₎ | 8.068 ₍₆₎ | 7.580 ₍₆₎ | 9.701 ₍₆₎ | 9.337 ₍₈₎ | 8.604 |
| 20 µg | 7.860 ₍₆₎ | 8.930 ₍₆₎ | 8.953 ₍₆₎ | 10.611 ₍₆₎ | 8.741 ₍₆₎ | 9.019 |
| Medias de los tiempos experimentales | 8.098 | 8.499 | 8.266 | 10.156 | 9.039 | |

Figura 9. Análisis y medias del peso de la biomasa durante el experimento de RNAi de *egfp* hasta el día 30 y sin incluir la concentración de 60 µg. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar de las diferentes medias. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra.



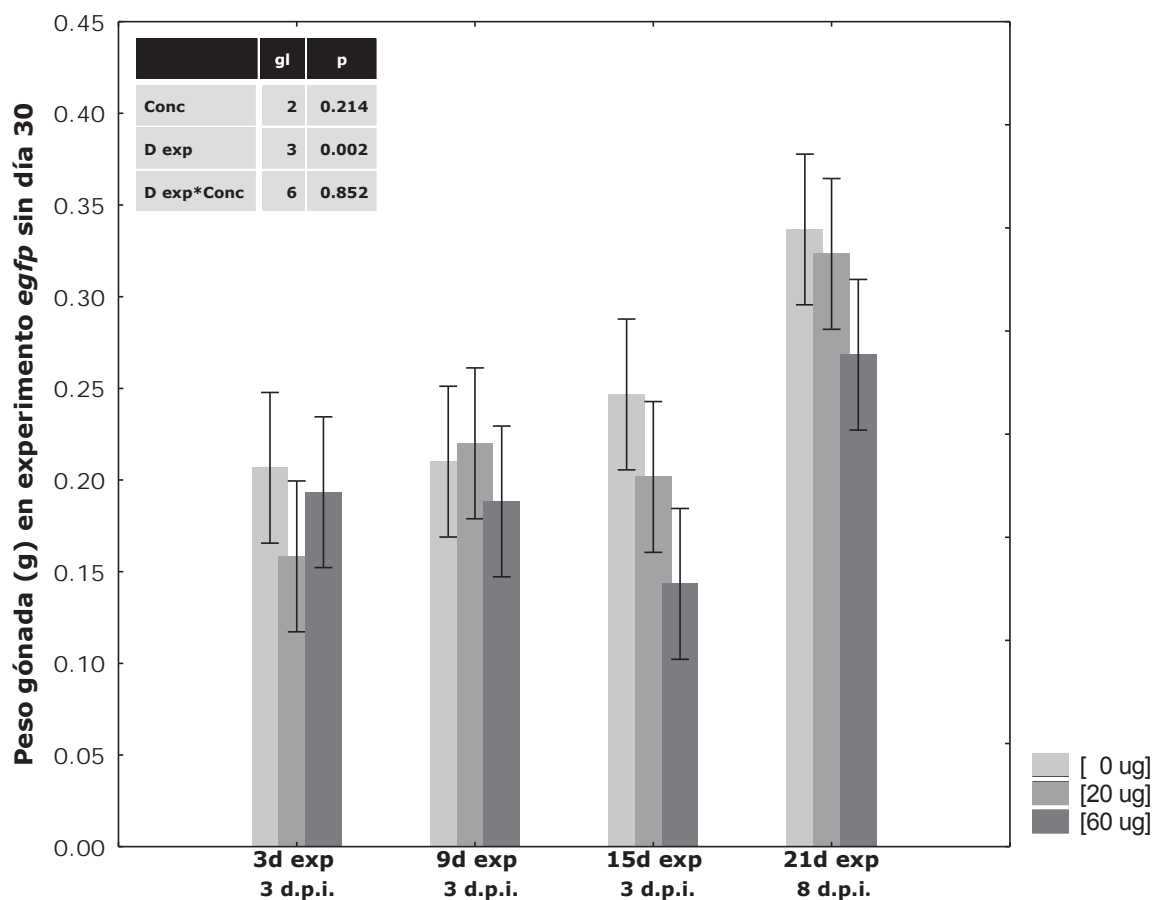
| Concentración | d3 | d9 | d15 | d21 | Media por concentración |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|
| 0 μg | 2.215 ₍₆₎ | 2.281 ₍₆₎ | 1.789 ₍₆₎ | 2.251 ₍₆₎ | 2.136 |
| 20 μg | 2.278 ₍₆₎ | 2.566 ₍₆₎ | 2.421 ₍₆₎ | 2.751 ₍₆₎ | 2.504 |
| 60 μg | 2.531 ₍₆₎ | 2.233 ₍₆₎ | 1.505 ₍₆₎ | 2.111 ₍₆₎ | 2.094 |
| Medias de los tiempos experimentales | 2.341 | 2.360 | 1.908 | 2.371 | |

Figura 10. Análisis y medias del peso del músculo durante el experimento de RNAi de *egfp* hasta el día 21, e incluyendo las tres concentraciones. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra.



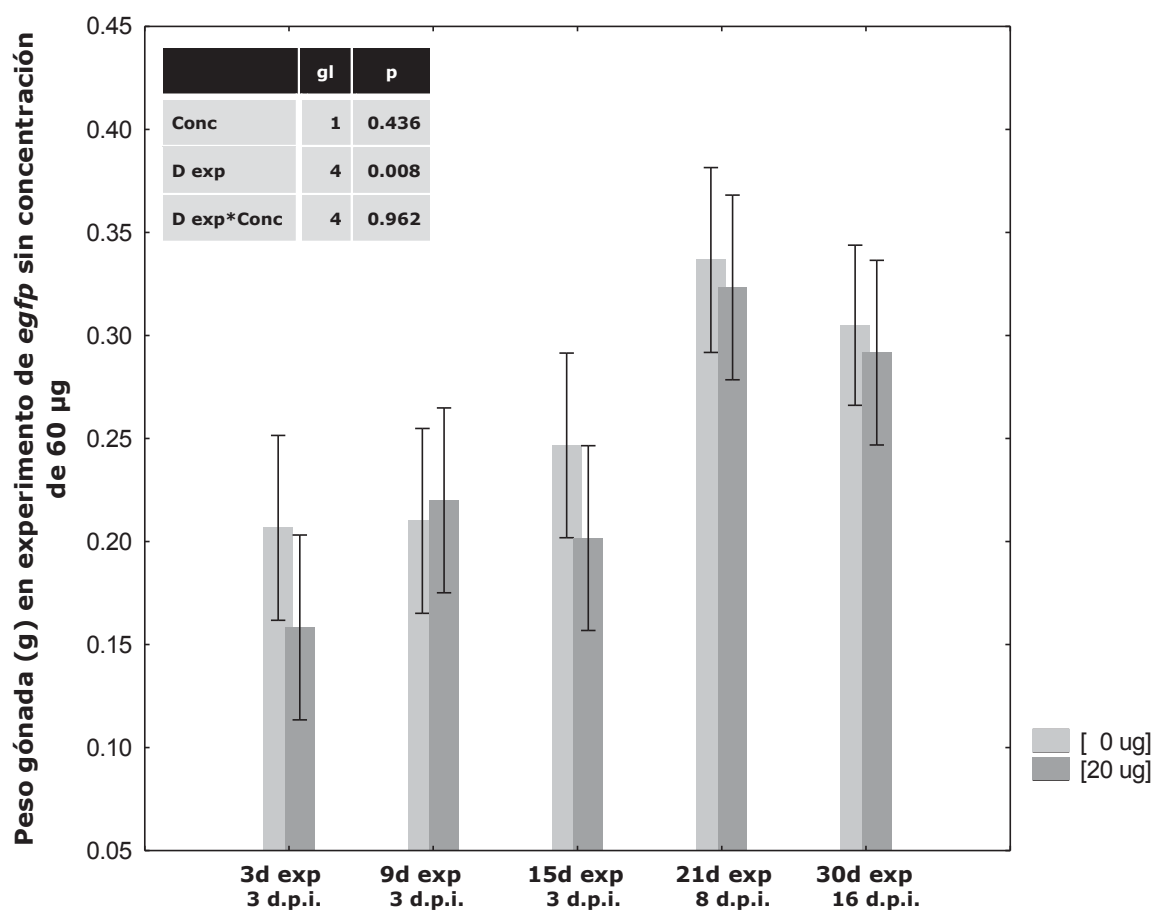
| Concentración | d3 | d9 | d15 | d21 | d30 | Media por concentración |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|
| 0 µg | 2.215 ₍₆₎ | 2.281 ₍₆₎ | 1.798 ₍₆₎ | 2.251 ₍₆₎ | 2.375 ₍₈₎ | 2.156 |
| 20 µg | 2.278 ₍₆₎ | 2.566 ₍₆₎ | 2.421 ₍₆₎ | 2.751 ₍₆₎ | 2.060 ₍₆₎ | 2.415 |
| Medias de los tiempos experimentales | 2.246 | 2.424 | 2.110 | 2.501 | 2.148 | |

Figura 11. Análisis y medias del peso del músculo durante el experimento de RNAi de *egfp* hasta el día 30 y sin incluir la concentración de 60 µg. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra.



| Concentración | d3 | d9 | d15 | d21 | Medias por concentración |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| 0 µg | 0.206 ₍₆₎ | 0.210 ₍₆₎ | 0.246 ₍₆₎ | 0.336 ₍₆₎ | 0.250 |
| 20 µg | 0.158 ₍₆₎ | 0.220 ₍₆₎ | 0.201 ₍₆₎ | 0.323 ₍₆₎ | 0.225 |
| 60 µg | 0.193 ₍₆₎ | 0.188 ₍₆₎ | 0.143 ₍₆₎ | 0.268 ₍₆₎ | 0.198 |
| Medias a lo largo del experimento | 0.186 ^A | 0.197 ^A | 0.206 ^A | 0.309 ^B | |

Figura 12. Análisis y medias del peso de la gónada durante el experimento de RNAi de *egfp* hasta el día 21, e incluyendo las tres concentraciones. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$).



| Concentración | d3 | d9 | d15 | d21 | d30 | Medias por concentración |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| 0 µg | 0.206 ₍₆₎ | 0.210 ₍₆₎ | 0.246 ₍₆₎ | 0.336 ₍₆₎ | 0.305 ₍₈₎ | 0.261 |
| 20 µg | 0.158 ₍₆₎ | 0.220 ₍₆₎ | 0.201 ₍₆₎ | 0.323 ₍₆₎ | 0.291 ₍₆₎ | 0.239 |
| Medias a lo largo del experimento | 0.182 ^A | 0.215 ^{AB} | 0.224 ^{AB} | 0.330 ^C | 0.298 ^{BC} | |

Figura 13. Análisis y medias del peso de la gónada durante el experimento de RNAi de *egfp* hasta el día 30 y sin incluir la concentración de 60 µg. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tabla VI. Mortalidades de los diferentes grupos experimentales

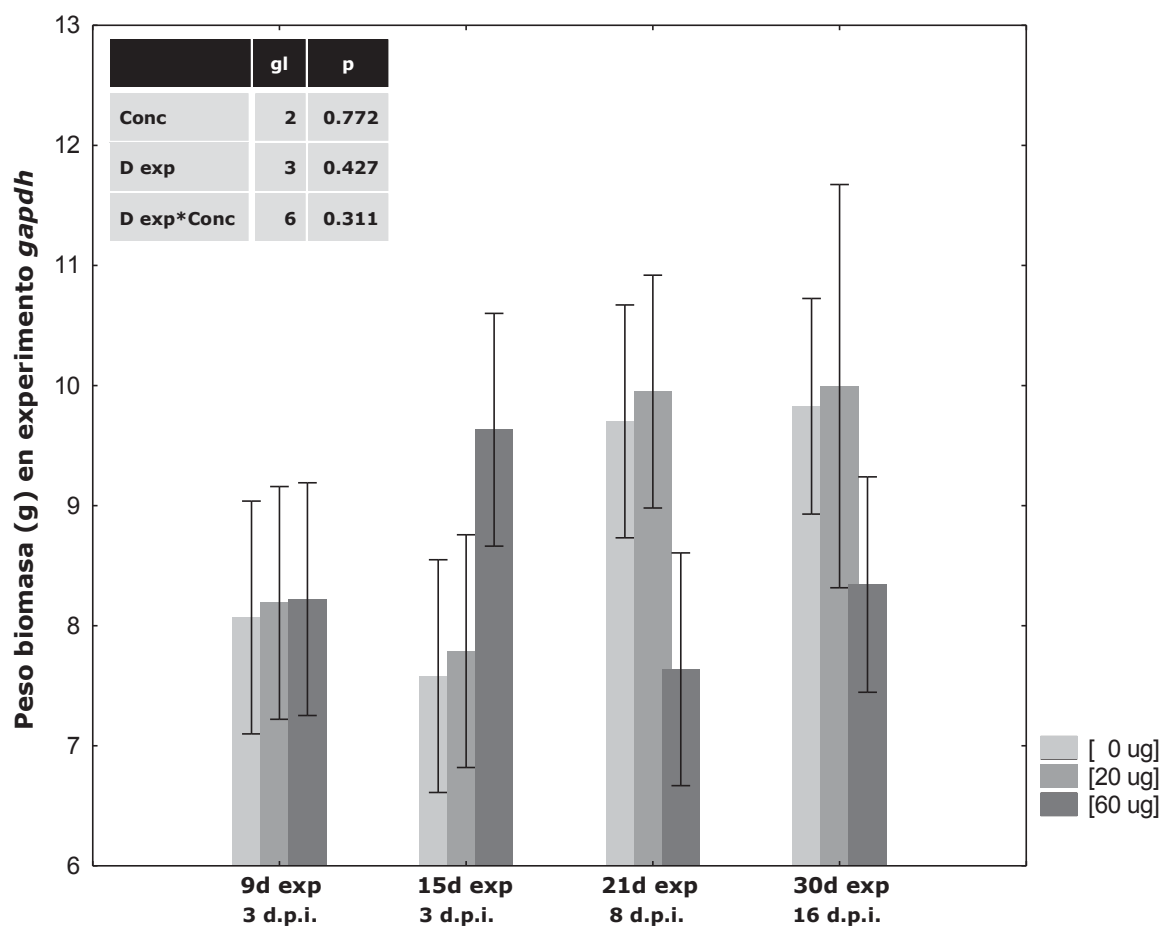
| Concentración (μg) | RNAi- <i>mstn</i> | RNAi- <i>gapdh</i> | RNAi- <i>egfp</i> | Solución Salina |
|---|-------------------|--------------------|-------------------|-----------------|
| 0 | na | na | na | 0% |
| 5 <i>mstn</i> , 20 <i>gapdh&egfp</i> | 3% | 19% | 3% | na |
| 30 <i>mstn</i> , 60 <i>gapdh&egfp</i> | 9% | 3% | 19% | na |
| Medias | 6% | 11% | 11% | 0% |

7.1.2 Peso de la biomasa, músculo aductor y gónada en el experimento de interferencia con dsRNA del gen vital *gapdh* utilizado como control positivo

El peso de la biomasa en el experimento de interferencia de *gapdh* no mostró diferencias significativas entre concentraciones, así como tampoco a lo largo de los días experimentales, aunque sí se observó una tendencia a mostrar un incremento en biomasa del inicio al final del experimento (Fig. 14).

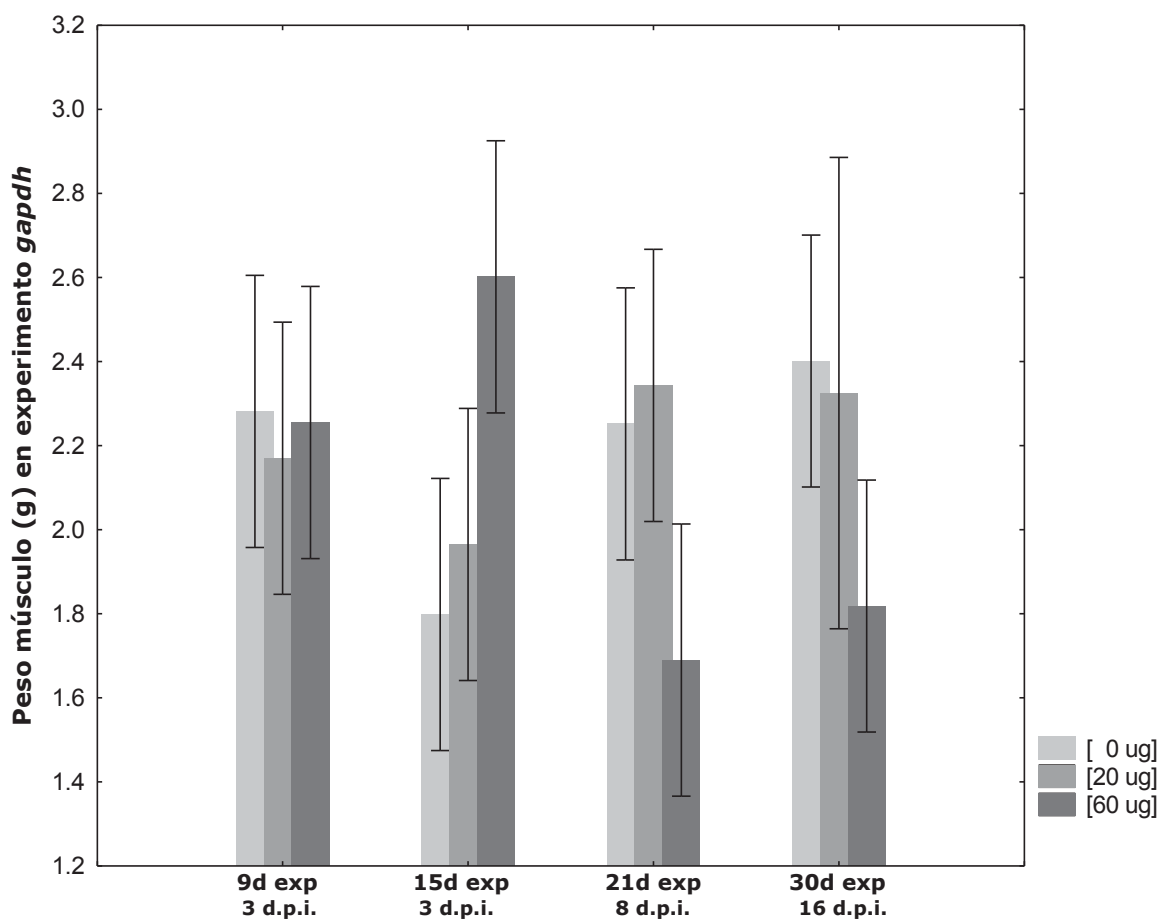
En el caso del peso del músculo aductor no se observaron diferencias significativas entre el peso muscular durante los días experimentales, así como tampoco hubo diferencias en peso de músculo entre los organismos inyectados con diferentes concentraciones de dsRNA-*gapdh* (Fig. 15).

A diferencia de lo observado en el caso de la biomasa y el músculo, el peso de la gónada incrementó significativamente a lo largo del experimento cuando se analiza el promedio de las tres concentraciones, pero en el caso de este gen, la interferencia resultó también en un decremento en peso de gónada para los organismos interferidos (20 y 60 μg dsRNA-*gapdh*) en contraste con el grupo control (0 μg), indicando un posible efecto negativo de la interferencia sobre la gametogénesis y/o maduración (Fig. 16). Es importante señalar que a los 30d experimentales solamente sobrevivieron 9 organismos (7 de la concentración de 60 μg y 2 de la concentración de 20 μg), y el promedio observado en ese muestreo podría ser el resultado de un sesgo experimental resultante del bajo número de individuos.



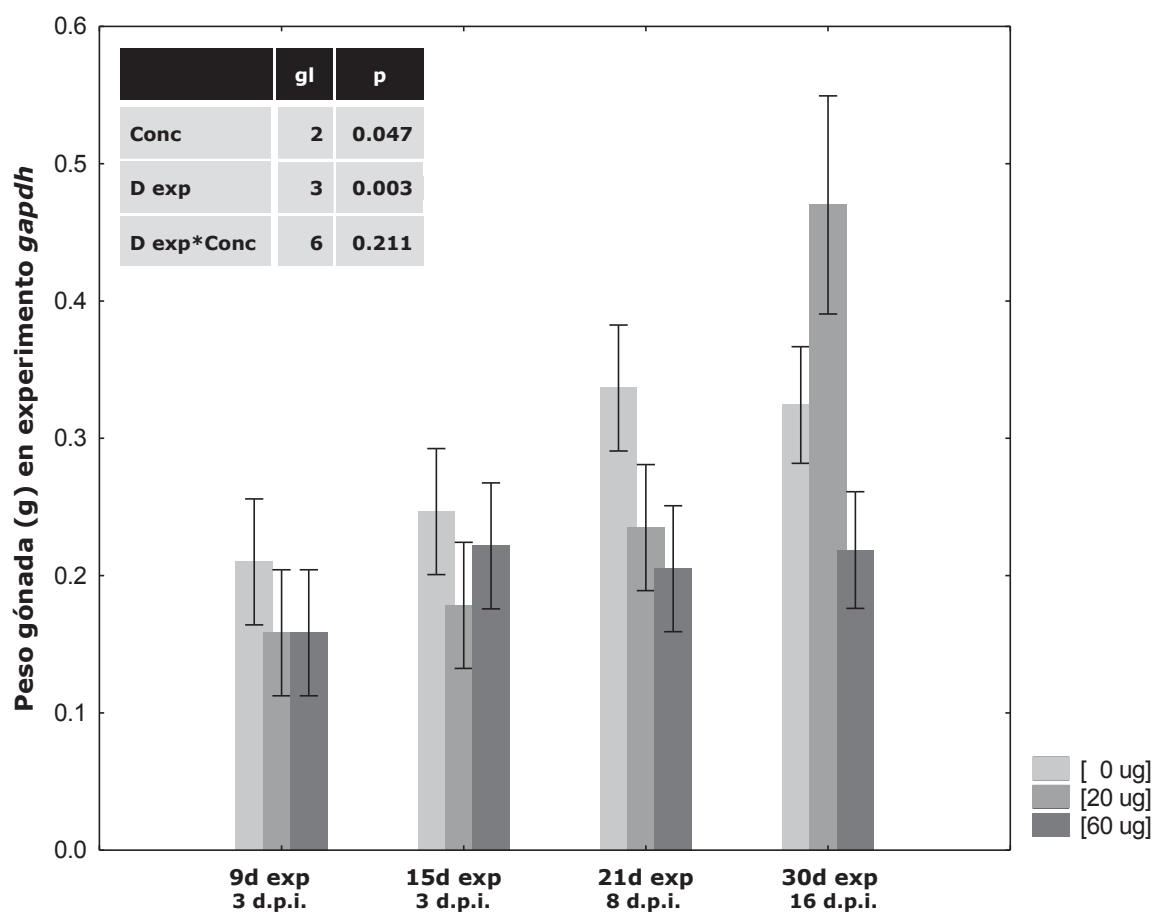
| Concentración | d9 | d15 | d21 | d30 | Medias por concentración |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| 0 μg | 8.068 ₍₆₎ | 7.580 ₍₆₎ | 9.701 ₍₆₎ | 9.827 ₍₇₎ | 8.794 |
| 20 μg | 8.190 ₍₆₎ | 7.788 ₍₆₎ | 9.950 ₍₆₎ | 9.995 ₍₂₎ | 8.980 |
| 60 μg | 8.221 ₍₆₎ | 9.631 ₍₆₎ | 7.636 ₍₆₎ | 8.342 ₍₇₎ | 8.458 |
| Medias a lo largo del experimento | 8.160 | 8.333 | 9.096 | 9.388 | |

Figura 14. Análisis y medias del peso de la biomasa durante el experimento de RNAi de *gapdh*. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra.



| Concentración | d9 | d15 | d21 | d30 | Medias por concentración |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| 0 μg | 2.281 ₍₆₎ | 1.798 ₍₆₎ | 2.251 ₍₆₎ | 2.401 ₍₇₎ | 2.183 |
| 20 μg | 2.179 ₍₆₎ | 1.965 ₍₆₎ | 2.343 ₍₆₎ | 2.325 ₍₂₎ | 2.200 |
| 60 μg | 2.255 ₍₆₎ | 2.601 ₍₆₎ | 1.690 ₍₆₎ | 1.181 ₍₇₎ | 2.091 |
| Medias a lo largo del experimento | 2.235 | 2.121 | 2.095 | 2.181 | |

Figura 15. Análisis y medias del peso del músculo durante el experimento de RNAi de *gapdh*. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra.



| Concentración | d9 | d15 | d21 | d30 | Medias por concentración |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| 0 μg | 0.210 ₍₆₎ | 0.246 ₍₆₎ | 0.336 ₍₆₎ | 0.324 ₍₇₎ | 0.281 ^A |
| 20 μg | 0.158 ₍₆₎ | 0.178 ₍₆₎ | 0.235 ₍₆₎ | 0.470 ₍₂₎ | 0.218 ^{AB} |
| 60 μg | 0.158 ₍₆₎ | 0.221 ₍₆₎ | 0.205 ₍₆₎ | 0.218 ₍₇₎ | 0.201 ^B |
| Medias a lo largo del experimento | 0.175 ^A | 0.215 ^{AB} | 0.258 ^{BC} | 0.296 ^C | |

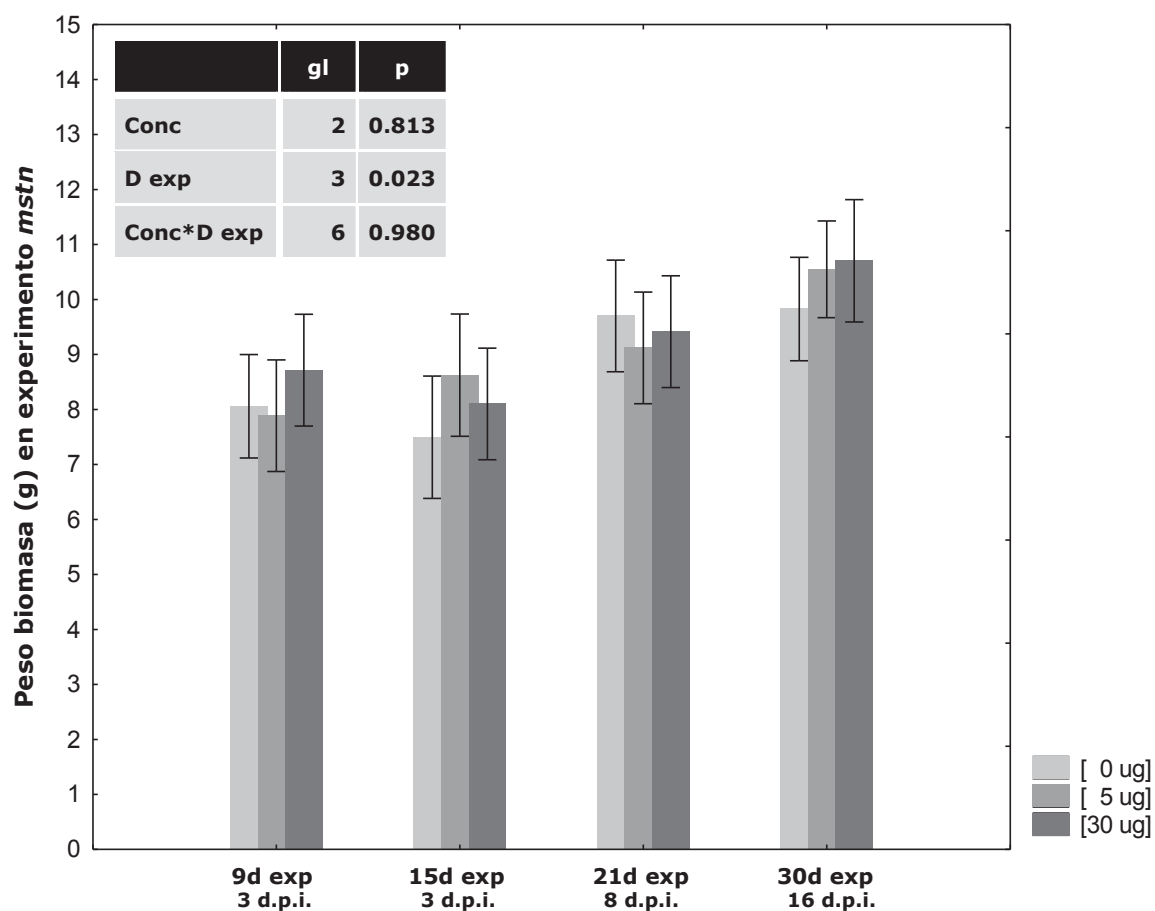
Figura 16. Análisis y medias del peso de la gónada durante el experimento de RNAi de *gapdh*. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.1.3 Peso de la biomasa, músculo aductor y gónada en el experimento de interferencia con dsRNA del gen de interés, *mstn*

Al igual que para los genes *egfp* y *gapdh*, en el experimento donde se inyectó la doble cadena de la *miostatina* los organismos experimentales mostraron un incremento significativo en biomasa a lo largo del experimento (Fig. 17). También como en los genes anteriores, las concentraciones evaluadas no resultaron en diferencias significativas en biomasa, aunque en este caso se observa una tendencia hacia un incremento en biomasa en las concentraciones de dsRNA-*mstn* de 5 y 30 μg con respecto al control (0 μg), una tendencia que no fue observada en el caso de *egfp* y *gapdh*.

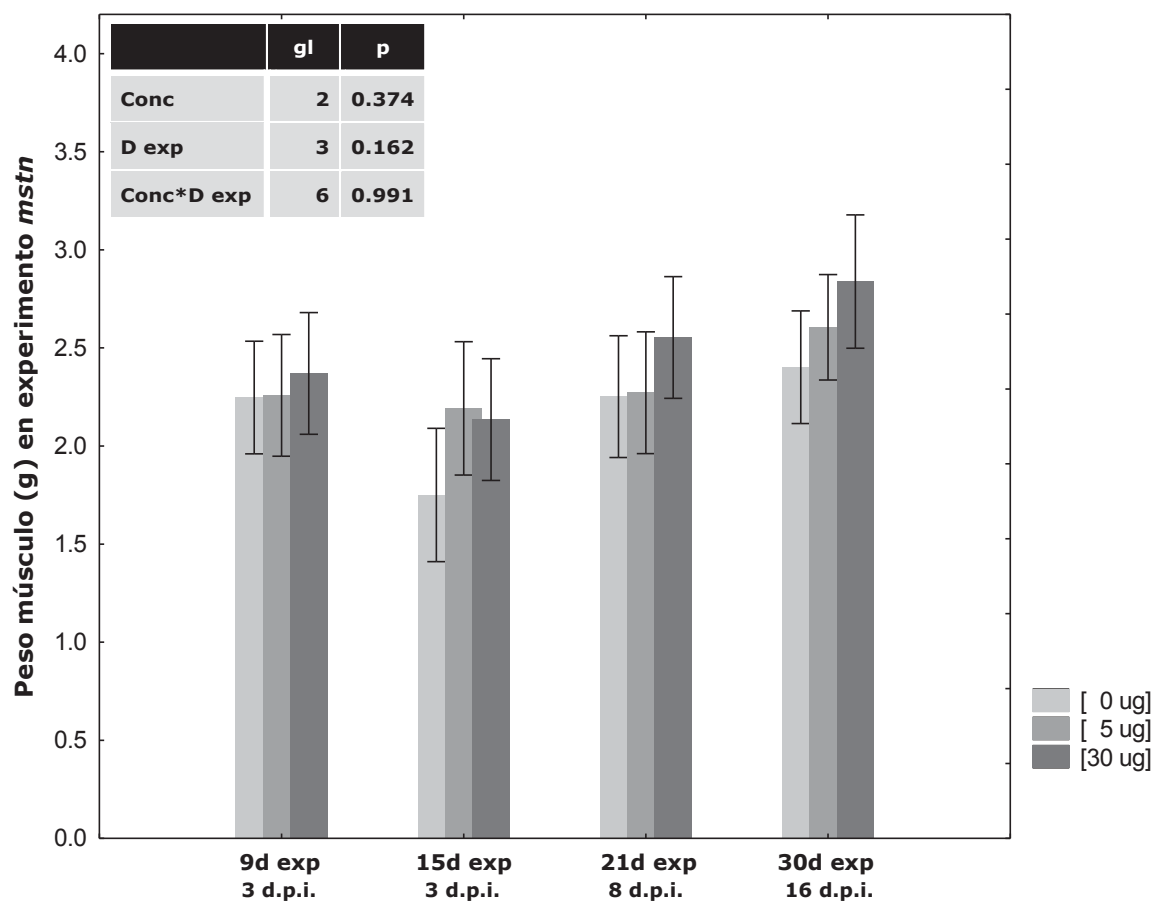
En el caso del peso del músculo aductor no se encontraron diferencias significativas a lo largo de los días experimentales así como tampoco entre las tres concentraciones de dsRNA-*mstn* evaluadas (Fig. 18). Sin embargo, al igual que en el caso de la biomasa, el peso del músculo aductor presentó una tendencia a incrementar de la concentración de 0 μg a la de 5 μg y finalmente a la de 30 μg , lo cual tampoco fue observado para el peso del músculo en los experimentos con *egfp* y *gapdh*.

Al igual que para los experimentos de interferencia donde se inyectaron *egfp* y *gapdh*, en el experimento de interferencia de la *mstn* el promedio del peso de la gónada de las tres concentraciones incrementó significativamente del inicio al final del experimento (Fig. 19). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el peso de la gónada entre concentraciones de dsRNA-*mstn* inyectada, así como tampoco se observó una tendencia hacia disminuir o incrementar con la concentración inyectada como se observó en el caso de *egfp*, donde se observó una tendencia a disminuir el peso de la gónada como incrementó la concentración evaluada, y para *gapdh* en donde el peso de la gónada si disminuyó significativamente de la menor a la mayor concentración.



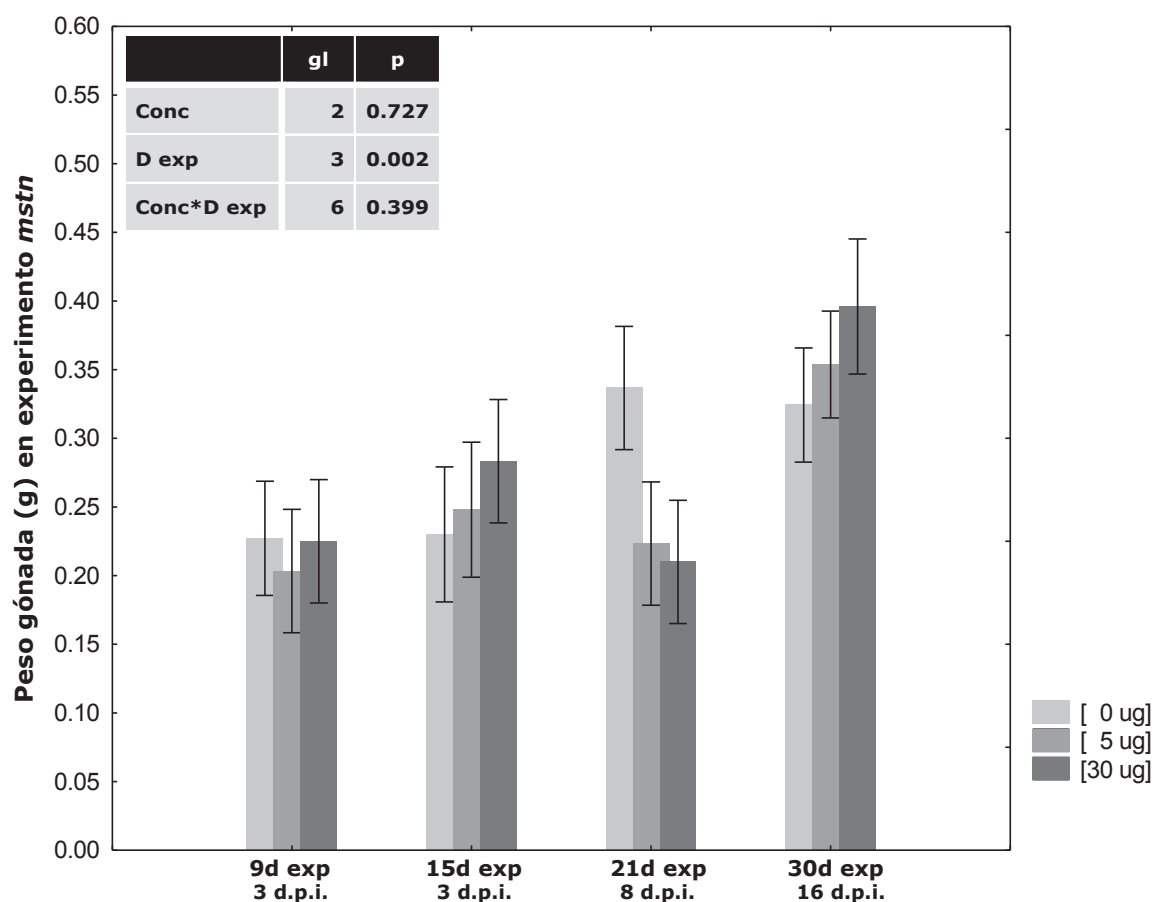
| Concentración | d9 | d15 | d21 | d30 | Medias por concentración |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------|
| 0 μg | 8.058 ₍₇₎ | 7.496 ₍₅₎ | 9.701 ₍₆₎ | 9.827 ₍₇₎ | 8.770 |
| 5 μg | 7.886 ₍₆₎ | 8.624 ₍₅₎ | 9.120 ₍₆₎ | 10.548 ₍₈₎ | 9.044 |
| 30 μg | 8.715 ₍₆₎ | 8.100 ₍₆₎ | 9.415 ₍₆₎ | 10.704 ₍₅₎ | 9.233 |
| Medias a lo largo del experimento | 8.211 ^A | 8.075 ^A | 9.412 ^{AB} | 10.335 ^B | |

Figura 17. Análisis y medias del peso de la biomasa durante el experimento de RNAi de *mstn*. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$).



| Concentración | d9 | d15 | d21 | d30 | Medias por concentración |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| 0 µg | 2.247 ₍₇₎ | 1.750 ₍₅₎ | 2.251 ₍₆₎ | 2.401 ₍₇₎ | 2.162 |
| 5 µg | 2.258 ₍₆₎ | 2.192 ₍₅₎ | 2.271 ₍₆₎ | 2.605 ₍₈₎ | 2.331 |
| 30 µg | 2.370 ₍₆₎ | 2.135 ₍₆₎ | 2.553 ₍₆₎ | 2.838 ₍₅₎ | 2.474 |
| Medias a lo largo del experimento | 2.291 | 2.025 | 2.358 | 2.614 | |

Figura 18. Análisis y medias del peso del músculo aductor durante el experimento de RNAi de *mstn*. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra.



| Concentración | d9 | d15 | d21 | d30 | Medias por concentración |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| 0 μ g | 0.227 ₍₇₎ | 0.230 ₍₅₎ | 0.336 ₍₆₎ | 0.324 ₍₇₎ | 0.281 |
| 5 μ g | 0.203 ₍₆₎ | 0.248 ₍₅₎ | 0.223 ₍₆₎ | 0.353 ₍₈₎ | 0.265 |
| 30 μ g | 0.225 ₍₆₎ | 0.283 ₍₆₎ | 0.210 ₍₆₎ | 0.396 ₍₅₎ | 0.273 |
| Medias a lo largo del experimento | 0.218 ^A | 0.255 ^A | 0.256 ^A | 0.354 ^B | |

Figura 19. Análisis y medias del peso de la gónada durante el experimento de RNAi de *mstn*. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.2 Cuantificación de los transcritos de la *mstn* y *gapdh* por PCR en tiempo real en músculo aductor estriado de *Nodipecten subnodosus* durante el silenciamiento génico con dsRNA.

Con el propósito de confirmar si hubo interferencia de los transcritos de los genes de *mstn* y *gapdh* por la doble cadena de RNA (dsRNA) aplicada durante el experimento de silenciamiento génico, se cuantificaron los transcritos de ambos genes por medio de PCR cuantitativo en tiempo real.

7.2.1 Estabilidad de los genes de referencia utilizados para la normalización de la expresión de los genes de la *mstn* y *gapdh*

De acuerdo al análisis efectuado con ayuda de la página de internet mencionada en la sección (6.4.3) de Materiales y Métodos, de los cuatro genes de referencia evaluados para la normalización de la expresión de *mstn* y *gapdh* en *N. subnodosus* se encontraron dos genes como los más estables para el análisis de la expresión, *rp-18* y *ef-1 α* . Estos dos genes mostraron el menor valor de variabilidad (*rp-18* 1.189 y *ef-1 α* 2.0) (Fig. 20), por lo que fueron los genes de referencia utilizados en la normalización de los datos de expresión.

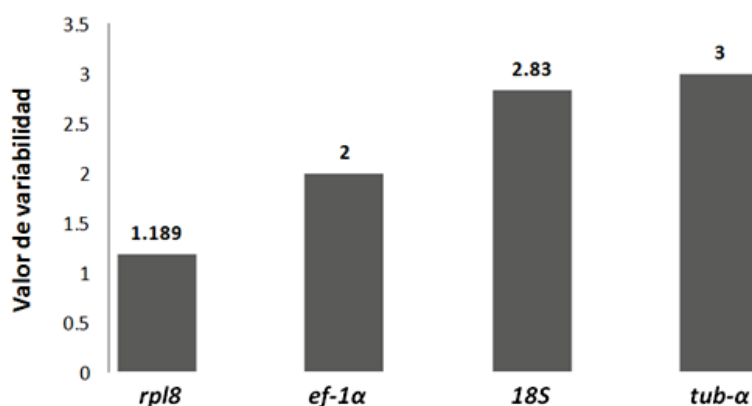


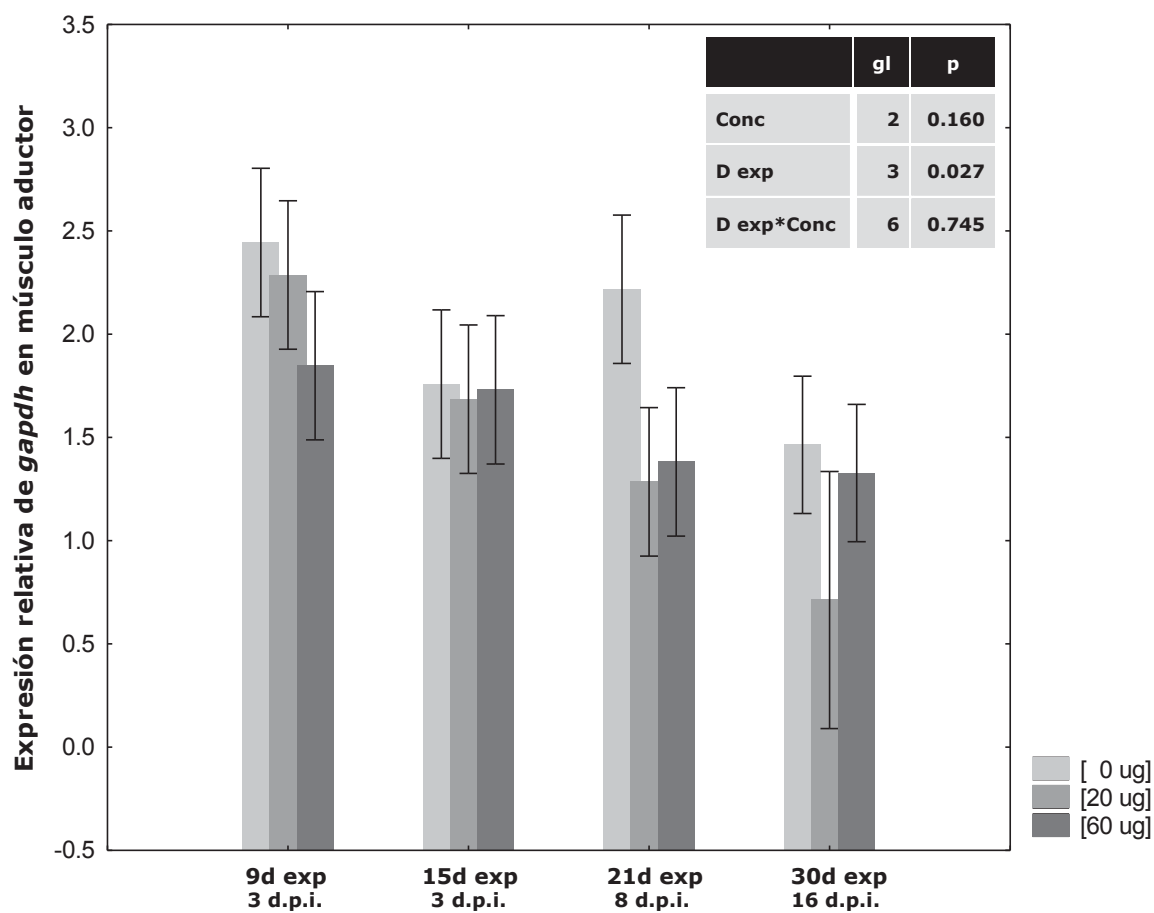
Figura 20. Estabilidad de los genes de referencia utilizados para la normalización de la expresión.

7.2.2. Evaluación del éxito de la interferencia a través de la estimación de la expresión relativa de los mRNA-gapdh presentes a lo largo de los días experimentales y concentraciones evaluadas de dsRNA-gapdh

Se observó un descenso en la expresión de *gapdh* únicamente cuando se promedian las tres concentraciones a lo largo del experimento, pero no se observaron diferencias significativas en la expresión relativa de *gapdh* entre concentraciones (Fig. 21). Sin embargo, es importante resaltar que se observan mayores niveles de expresión de *gapdh* en el grupo control, inyectado solamente con solución salina (0 μg dsRNA-*gapdh*).

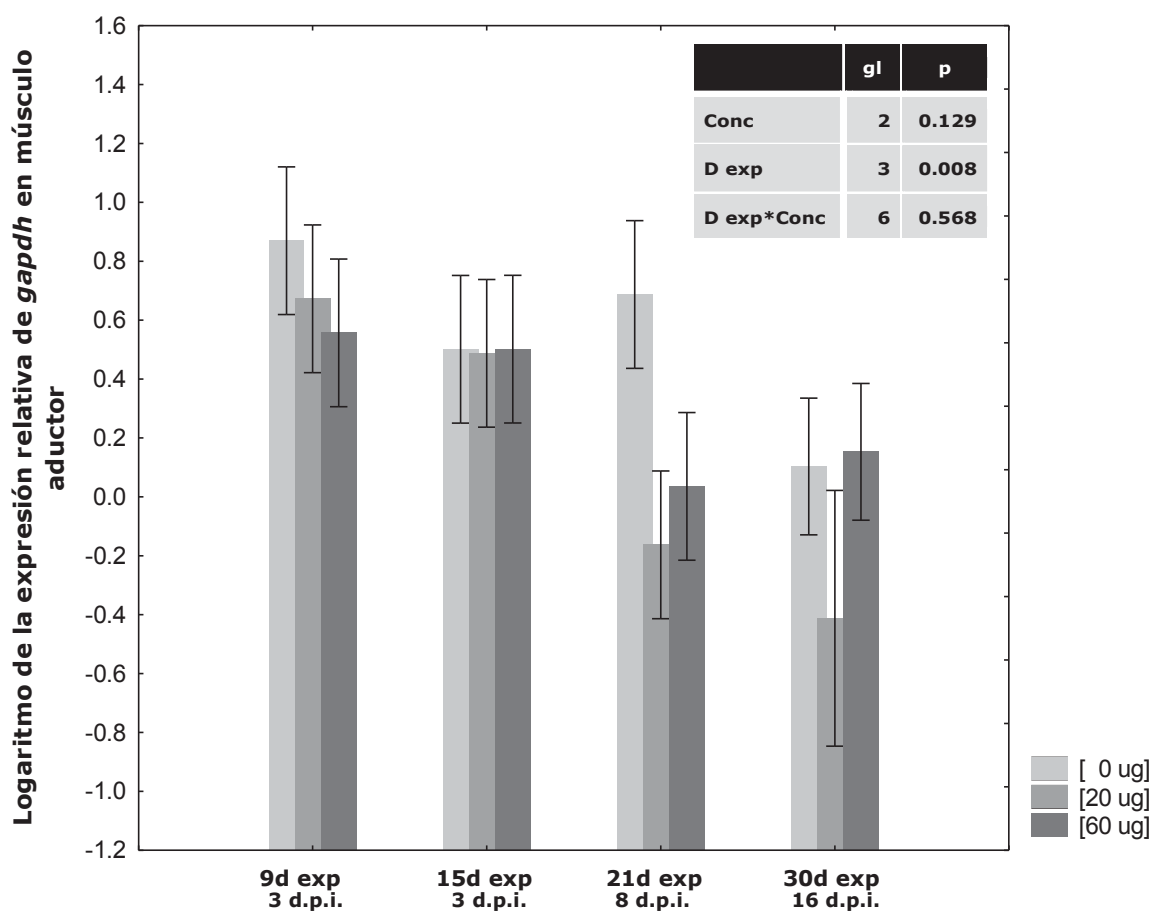
Al transformar a logaritmos para ajustar los datos a una distribución normal, se encontró un menor valor de P para el factor ‘días experimentales’, pero al igual que en el ANOVA sin transformar, no se observaron diferencias en la expresión de *gapdh* entre concentraciones (Fig. 22) indicando que no existía un problema de normalidad.

Como se mencionó en la sección 6.6.2 de la metodología, el uso de covariables en un ANOVA se justifica cuando se sabe o se puede inferir que existe una variable que puede estar afectando indirectamente a la variable de interés, en este caso la expresión génica. La introducción del peso de la gónada como covariable (Fig. 23) para corregir los datos por el efecto del crecimiento de la misma a lo largo de los días experimentales indicó que esta covariable era significativa, y al considerar ese crecimiento gonadal en el análisis se logró un ajuste de los valores de expresión. Esto es, al introducir la covariable “gónada” se encontraron adicionalmente a las diferencias significativas de la expresión relativa de *gapdh* en el promedio de las tres concentraciones del inicio al final del experimento, diferencias en la expresión relativa de *gapdh* entre el grupo control inyectado solamente con solución salina (0 μg dsRNA) y la expresión relativa de los dos grupos inyectados con la dsRNA (20 y 60 μg dsRNA-*gapdh*), con los dos últimos presentando una expresión significativamente menor que la expresión del grupo control.



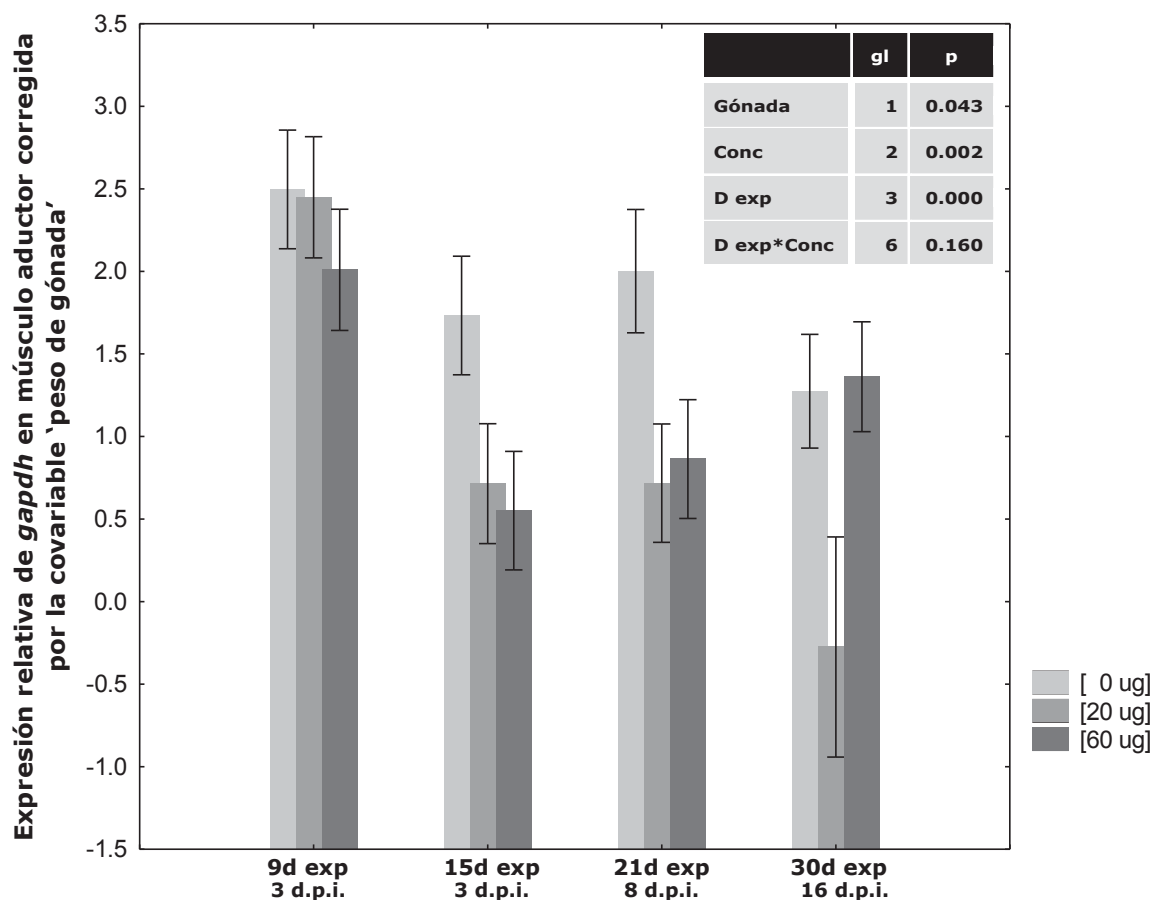
| Concentración | d9 | d15 | d21 | d30 | Medias por concentración |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| 0 μg | 2.443 ₍₆₎ | 1.757 ₍₆₎ | 2.217 ₍₆₎ | 1.464 ₍₇₎ | 1.970 |
| 20 μg | 2.286 ₍₆₎ | 1.685 ₍₆₎ | 1.284 ₍₆₎ | 0.712 ₍₂₎ | 1.492 |
| 60 μg | 1.847 ₍₆₎ | 1.730 ₍₆₎ | 1.381 ₍₆₎ | 1.327 ₍₇₎ | 1.571 |
| Medias a lo largo del experimento | 2.192 ^A | 1.724 ^{AB} | 1.628 ^{AB} | 1.310 ^B | |

Figura 21. Análisis de la expresión relativa de *gapdh* en músculo aductor durante el experimento de RNAi-*gapdh*. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$).



| Concentración | d9 | d15 | d21 | d30 | Medias por concentración |
|--|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|
| 0 μ g | 0.869 ₍₆₎ | 0.501 ₍₆₎ | 0.687 ₍₆₎ | 0.103 ₍₇₎ | 0.540 |
| 20 μ g | 0.672 ₍₆₎ | 0.487 ₍₆₎ | -0.162 ₍₆₎ | -0.412 ₍₂₎ | 0.146 |
| 60 μ g | 0.556 ₍₆₎ | 0.501 ₍₆₎ | 0.035 ₍₆₎ | 0.153 ₍₇₎ | 0.311 |
| Medias a lo largo del experimento | 0.699 ^A | 0.496 ^{AB} | 0.186 ^{AB} | 0.060 ^B | |

Figura 22. Análisis del logaritmo de la expresión relativa de *gapdh* en músculo aductor durante el experimento de RNAi-*gapdh*. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$).



| Concentración | d9 | d15 | d21 | d30 | Medias por concentración |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------|
| 0 μ g | 2.496 ₍₆₎ | 1.732 ₍₆₎ | 2.001 ₍₆₎ | 1.274 ₍₇₎ | 1.950 ^A |
| 20 μ g | 2.449 ₍₆₎ | 0.714 ₍₆₎ | 0.717 ₍₆₎ | -0.275 ₍₂₎ | 1.101 ^B |
| 60 μ g | 2.009 ₍₆₎ | 0.551 ₍₆₎ | 0.863 ₍₆₎ | 1.362 ₍₇₎ | 1.132 ^B |
| Medias a lo largo del experimento | 2.192 ^A | 0.958 ^B | 1.245 ^B | 1.249 ^B | |

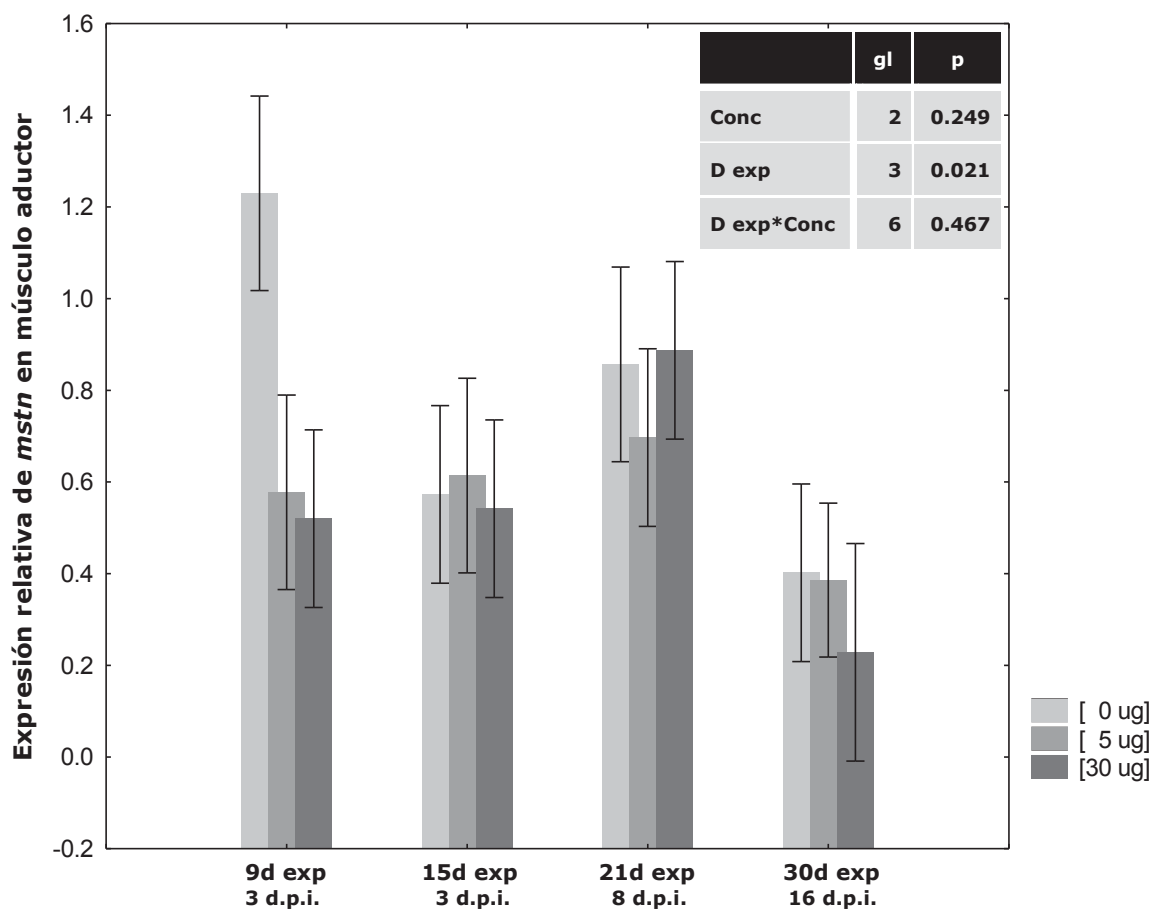
Figura 23. Análisis y medias de la expresión relativa de *gapdh* en músculo aductor durante el experimento de RNAi-*gapdh* al introducir como covariable el peso de la gónada. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento y en las medias por concentración indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.2.3 Evaluación del éxito de la interferencia del transcrito de la *mstn* través de la estimación de la expresión relativa de los mRNA-*mstn* a lo largo de los días experimentales y concentraciones evaluadas de dsRNA-*mstn*

El ANOVA indicó un descenso significativo en la expresión relativa de la *mstn* a lo largo de los días experimentales cuando se consideraron las medias resultantes del promedio de las tres concentraciones evaluadas, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en la expresión relativa de la *mstn* entre concentraciones (Fig. 24). Por otro lado, es necesario mencionar que se observó una tendencia a una mayor expresión relativa de la *mstn* en el grupo control, inyectado solamente con solución salina (0 μg dsRNA) que la encontrada en ambos grupos inyectados con la dsRNA-*mstn* (5 y 30 μg).

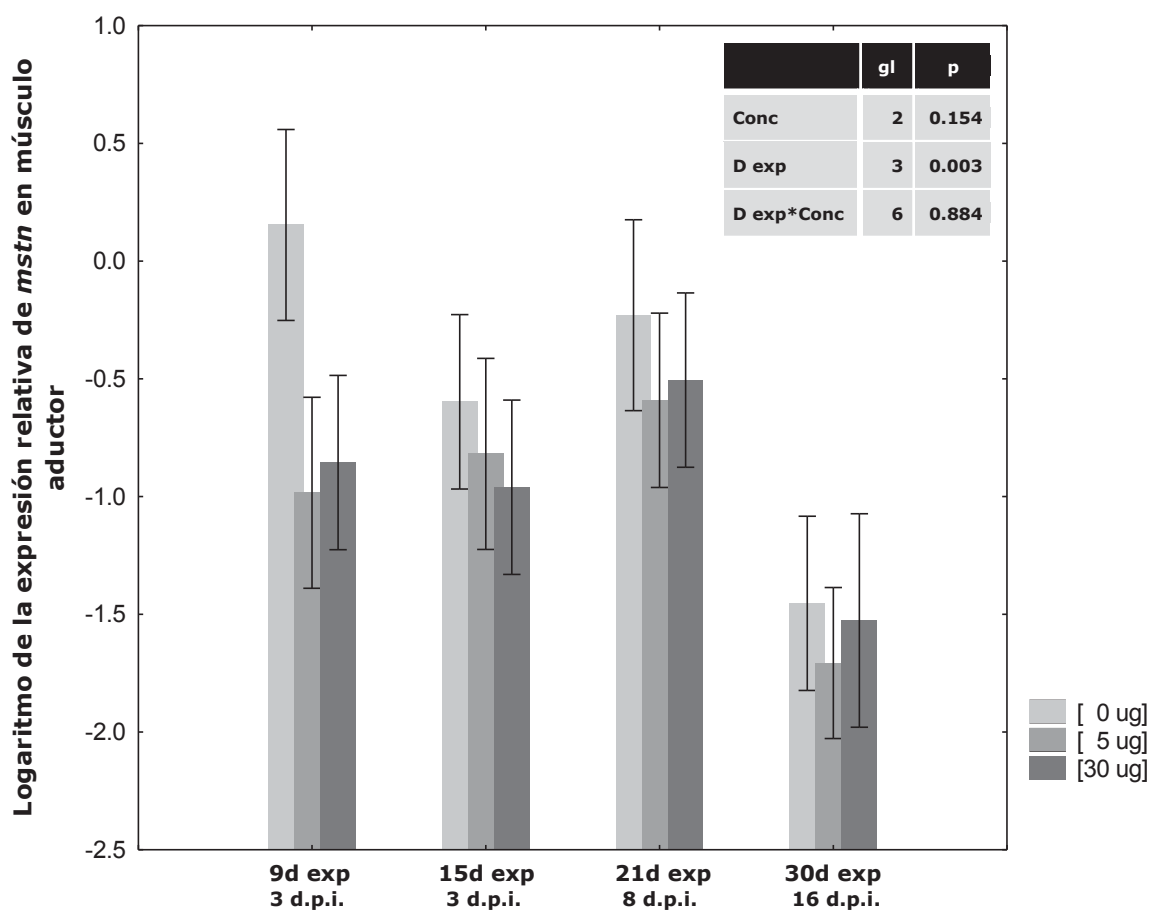
Los valores de la expresión relativa de la *mstn* se transformaron a logaritmos para incrementar la normalidad de los datos, encontrando un valor de P menor en el factor de ‘días experimentales’; pero de la misma manera que en el ANOVA sin transformar, no se observaron diferencias significativas entre concentraciones (Fig. 25).

De la misma manera que en el caso de la expresión relativa de *gapdh*, se utilizó la covariable de peso de la gónada buscando corregir los datos de expresión relativa de la *mstn* por el efecto de la maduración gonádica a lo largo de los días experimentales (Fig. 26), encontrando que aunque esta covariable sólo mostró un valor de $P=0.096$, su introducción en el análisis resultó en diferencias significativas entre las concentraciones de la expresión relativa. Esto es, excepto por el día 15, la expresión relativa encontrada en los organismos inyectados solamente con solución salina (0 μg dsRNA) fue significativamente mayor que la expresión relativa estimada para las concentraciones inyectadas de 5 y 30 μg dsRNA-*mstn*.



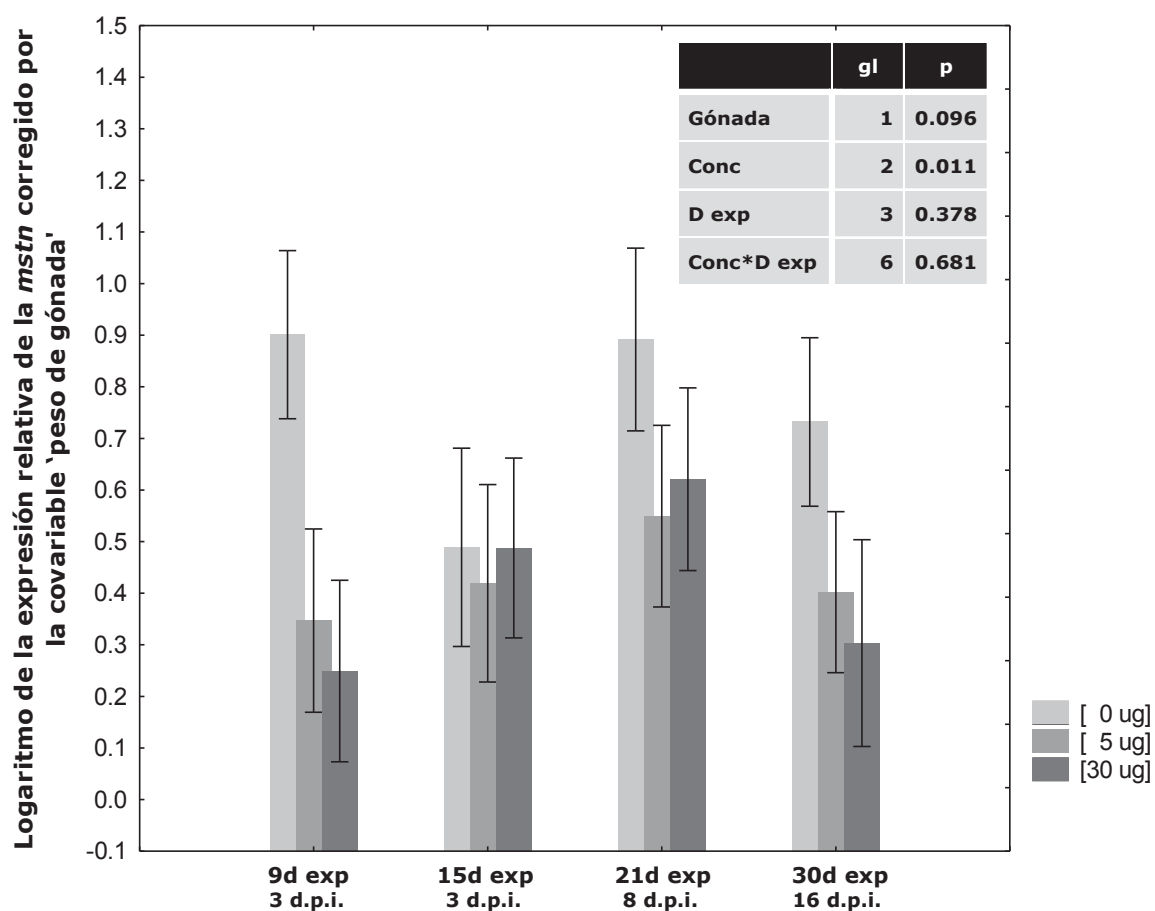
| Concentración | d9 | d15 | d21 | d30 | Medias por concentración |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| 0 μ g | 1.229 ₍₅₎ | 0.572 ₍₆₎ | 0.856 ₍₅₎ | 0.401 ₍₆₎ | 0.765 |
| 5 μ g | 0.577 ₍₅₎ | 0.614 ₍₅₎ | 0.696 ₍₆₎ | 0.385 ₍₈₎ | 0.568 |
| 30 μ g | 0.519 ₍₆₎ | 0.541 ₍₆₎ | 0.887 ₍₆₎ | 0.228 ₍₄₎ | 0.544 |
| Medias a lo largo del experimento | 0.759 ^A | 0.573 ^{AB} | 0.811 ^A | 0.356 ^B | |

Figura 24. Análisis y medias de la expresión relativa de *mstn* en músculo aductor durante el experimento de RNAi-*mstn*. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$).



| Concentración | d9 | d15 | d21 | d30 | Medias por concentración |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|
| 0 µg | 0.153 ₍₅₎ | -0.597 ₍₆₎ | -0.229 ₍₅₎ | -1.453 ₍₆₎ | -0.531 |
| 5 µg | -0.983 ₍₅₎ | -0.818 ₍₅₎ | -0.591 ₍₆₎ | -1.707 ₍₈₎ | -1.025 |
| 30 µg | -0.855 ₍₆₎ | -0.960 ₍₆₎ | -0.505 ₍₆₎ | -1.526 ₍₄₎ | -0.961 |
| Medias a lo largo del experimento | -0.580 ^A | -0.790 ^A | -0.454 ^A | -1.582 ^B | |

Figura 25. Análisis y medias del logaritmo de la expresión relativa de la *mstn* en músculo aductor durante el experimento de RNAi-*mstn*. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias a lo largo del experimento indican diferencias significativas ($P < 0.05$).



| Concentración | d9 | d15 | d21 | d30 | Medias por concentración |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| 0 μg | 0.900 ₍₆₎ | 0.488 ₍₆₎ | 0.891 ₍₆₎ | 0.731 ₍₇₎ | 0.762 ^A |
| 5 μg | 0.346 ₍₆₎ | 0.419 ₍₅₎ | 0.549 ₍₆₎ | 0.401 ₍₈₎ | 0.434 ^B |
| 30 μg | 0.249 ₍₆₎ | 0.487 ₍₆₎ | 0.620 ₍₆₎ | 0.303 ₍₅₎ | 0.419 ^B |
| Medias a lo largo del experimento | 0.499 | 0.465 | 0.687 | 0.479 | |

Figura 26. Análisis y medias del logaritmo de la expresión relativa de la *mstn* en músculo aductor durante el experimento de RNAi-*mstn* al introducir como covariable el peso de la gónada. Las barras verticales representan las medias por concentración y muestreo a lo largo del experimento, y las líneas hacia arriba y abajo muestran el error estándar. Números en subíndices subrayados y en paréntesis indican el tamaño de muestra. Letras diferentes en las medias por concentración indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.3 Análisis de hipertrofia e hiperplasia en músculo estriado de *N. subnodosus*

7.3.1 Análisis de hipertrofia en músculo estriado de N. subnodosus

Como se mencionó anteriormente en la sección de Materiales y Métodos (Sección 6.5.2), se utilizaron imágenes digitalizadas en cortes transversales de músculo aductor provenientes de organismos muestreados al inicio y final del experimento (Md 3 y Md 30), midiendo el contorno de 200 fibras musculares de cada individuo y comparándolas entre días del experimento para poder determinar si hubo un incremento en el tamaño de las fibras.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis exploratorio del tipo ‘cajas con valores mínimos y extremos’ para mostrar la dispersión de los datos (Fig. 27). Se encontraron datos atípicos al inicio del experimento (Md 3) en el grupo interferido con 5 µg dsRNA-*mstn*, mientras que en el grupo interferido con 30 µg dsRNA-*mstn* no se observaron datos atípicos, pero sí una alta dispersión. Al final del experimento (Md 30) se encontraron datos atípicos en el grupo control (0 µg dsRNA) y en el grupo interferido con 30 µg dsRNA-*mstn*, pero ninguno de los grupos experimentales mostró una alta dispersión.

Con base en el análisis de cajas con valores mínimos y extremos’ se procedió a la eliminación de datos atípicos, seguido de un análisis de varianza de dos vías con los factores concentración y días experimentales, encontrando diferencias significativas entre días experimentales ($P < 0.05$); las medias (promedio de las tres concentraciones) indicaron que el tamaño de las fibras musculares al final del experimento (Md 30) fue menor comparado al inicio del experimento (Md 3) (Fig. 28), debido principalmente a que el grupo interferido con la mayor concentración (30 µg dsRNA-*mstn*) presentó desde el inicio del experimento un mayor número de fibras musculares.

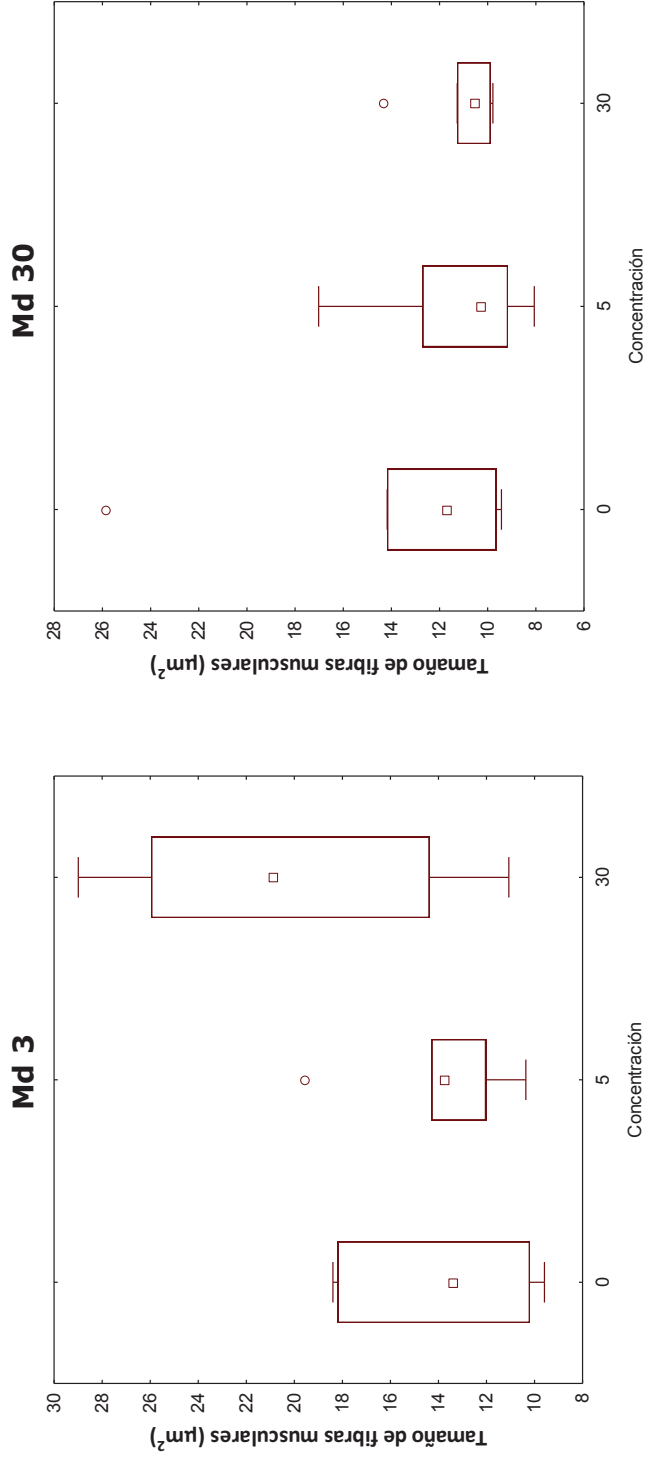
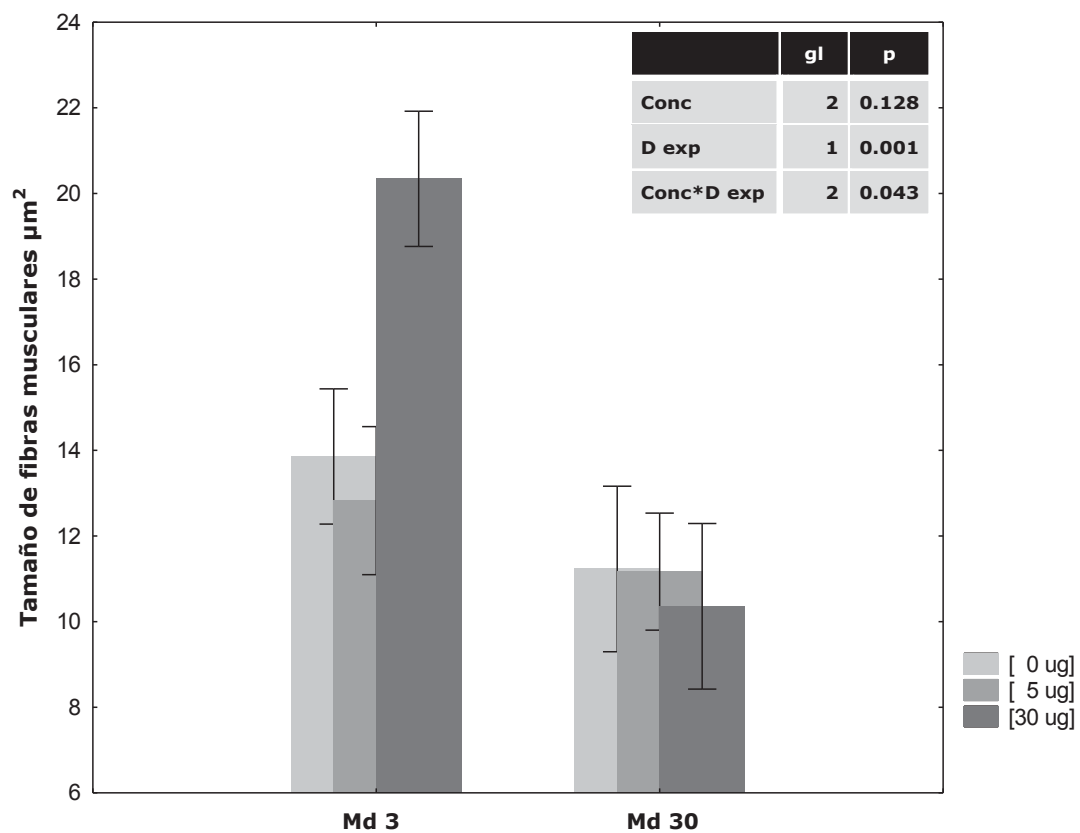


Figura 27. Diagramas de ‘cajas con valores mínimos y extremos’ de los datos de hipertrofia. (A) Diagrama de dispersión mostrando los datos del muestreo realizado a los tres días. (B) Diagrama de dispersión mostrando los datos del muestreo realizado a los 30 días. Los cuadros pequeños representan la media de los datos; en los recuadros pequeños se representa el 25-75% de los datos; los círculos representan los valores atípicos.



| Concentración | d3 | d30 | Medias por concentración |
|--|--------------------|--------------------|--------------------------|
| 0 µg | 13.85 | 11.23 | 12.54 |
| 5 µg | 12.82 | 11.16 | 11.99 |
| 30 µg | 20.34 | 10.35 | 15.34 |
| Medias a lo largo del experimento | 15.84 ^A | 10.98 ^B | |

Figura 28. Análisis de hipertrofia de músculo estriado de *N. subnodosus*. Las barras indican el área promedio de las fibras por concentración y las líneas su error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.3.2. Análisis de hiperplasia en músculo estriado de *N. subnodosus*

De la misma manera como se realizó el análisis de hipertrofia, se utilizaron las imágenes digitalizadas de cortes transversales de músculo estriado y se contaron todas las fibras presentes en cada imagen, este número de fibras fue utilizado junto con el área total del musculo, para sacar la relación de número de fibras por mm^2 .

Se encontraron dos valores atípicos extremos al inicio (Md 3) en el grupo control (0 μg dsRNA), mientras que en los grupos interferidos con 5 μg y 30 μg (dsRNA-*mstn*) no se observaron datos atípicos. Al final del experimento (Md 30) ningún grupo experimental mostró datos atípicos (Fig. 29).

Los datos atípicos extremos fueron removidos y se realizó un análisis de varianza de dos vías, con los factores de concentración y días experimentales; no se encontraron diferencias significativas entre concentraciones para el número de fibras por músculo, así como tampoco se observó tendencia alguna, pero sí se encontraron diferencias significativas entre días experimentales ($P < 0.05$), observándose un incremento significativo en el número de fibras por mm^2 entre el inicio y el final del experimento (Md 3 a Md 30) (Fig. 30).

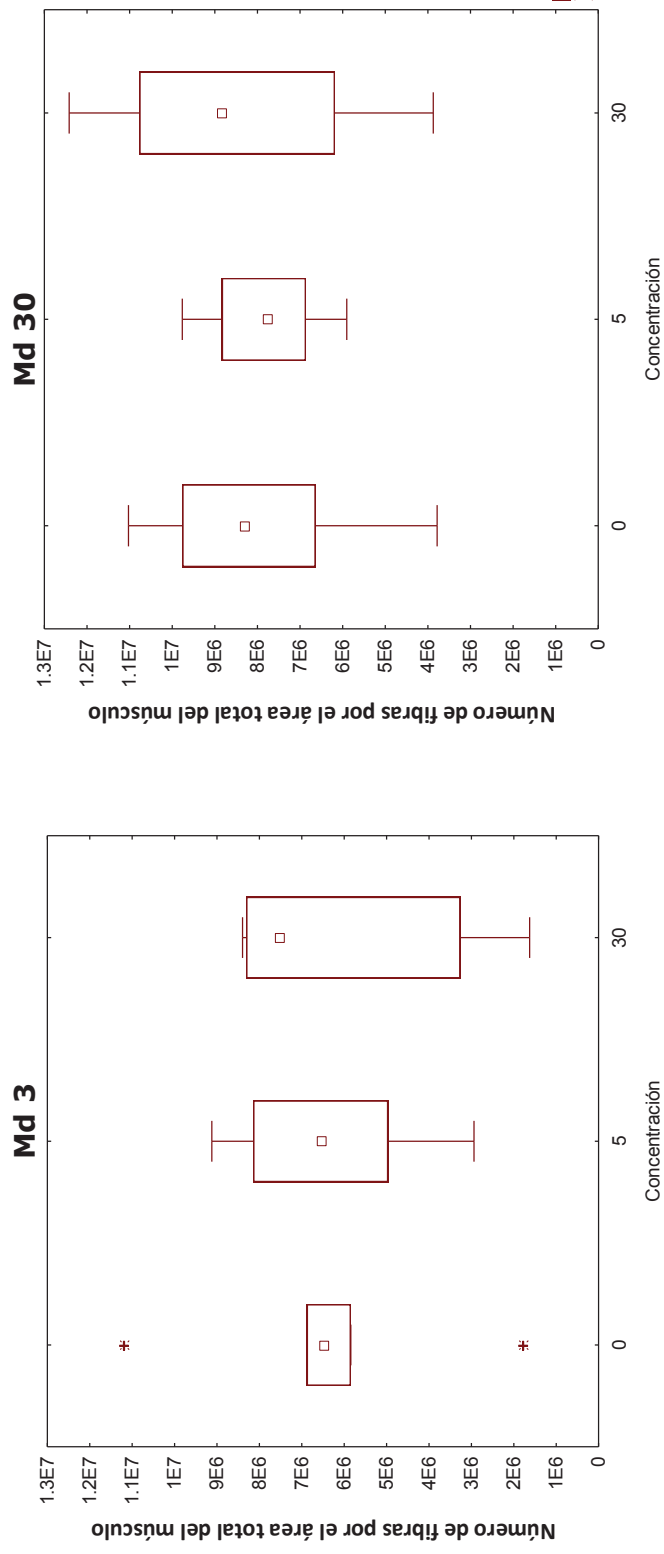
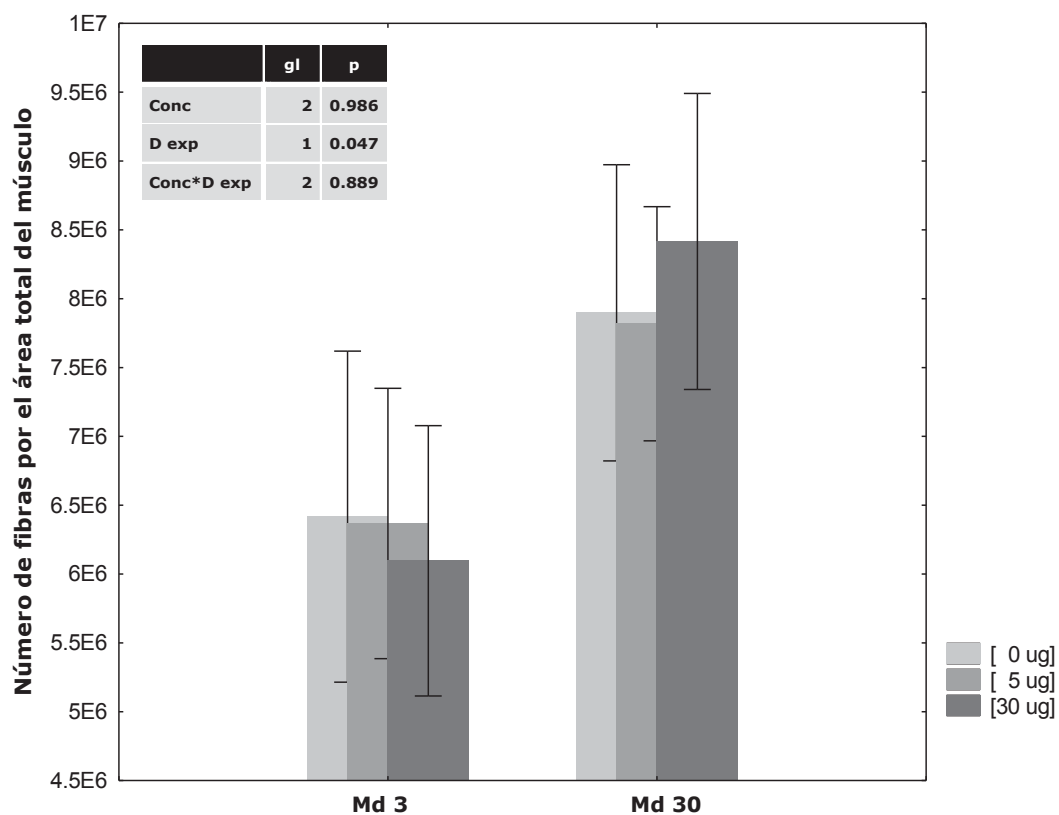


Figura 29. Diagramas de ‘cajas con valores mínimos y extremos’ de los datos de hiperplasia. (A) Diagrama de dispersión mostrando los datos del muestreo realizado a los tres días. (B) Diagrama de dispersión mostrando los datos del muestreo realizado a los 30 días. Los cuadros pequeños representan la media de los datos; en los recuadros grandes se representa el 25-75% de los datos; los círculos representan los valores atípicos y los asteriscos los datos extremos.



| Concentración | d3 | d30 | Medias por concentración |
|--|-------------------|-------------------|--------------------------|
| 0 µg | 6.42 | 7.90 | 7.16 |
| 5 µg | 6.37 | 7.82 | 7.09 |
| 30 µg | 6.10 | 8.42 | 7.26 |
| Medias a lo largo del experimento | 6.29 ^A | 8.04 ^B | |

Figura 30. Análisis de hiperplasia de músculo estriado de *N. subnodosus*, estimado a partir del número de fibras por área. Las barras indican las medias por concentración y las líneas su error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los organismos estaban iniciando la maduración gonádica, evidenciado por el incremento en el peso de la gónada en todos los experimentos realizados. El análisis de los niveles relativos de expresión de la *miostatina* (*mstn*) sin considerar la maduración gonádica mostraron un descenso en los niveles de expresión con respecto al tiempo, pero no mostraron diferencias entre las concentraciones evaluadas; al introducir como covariable el peso de la gónada se observó una disminución en la expresión de *mstn* de 55% a 57% con relación al control inyectado con solución salina.

De manera similar, el gen *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa* (*gapdh*) también mostró un decremento en todos los grupos interferidos al final del experimento, pero no se observaron diferencias entre concentraciones. Sin embargo, al introducir como covariable el peso de la gónada se observó una disminución en la expresión de *gapdh* de 56% a 58% con relación al control negativo inyectado con solución salina. También se observó un decremento en los valores medios de expresión de los grupos interferidos del inicio al final del experimento

El gen exógeno de la *proteína verde fluorescente mejorada* (*enhanced green fluorescent protein, egfp*) también mostró un incremento en el peso de la gónada durante el experimento, sin embargo, la inyección de la doble cadena de este gen resultó en un posible efecto off-target, evidenciado por una mortalidad total al final del experimento en concentración más alta (60 µg).

En un estudio previo realizado con organismos de esta especie mantenidos en Bahía de Loreto por Morelos *et al.* (2015), se encontró que los niveles de expresión de *mstn* fluctuaron en relación a la edad fisiológica y reproductiva de los organismos. Aunque el sitio de estudio fue diferente, se ha reportado que la primera actividad gametogénica ocurre en el mes de junio, cuando los organismos alcanzan una longitud entre 50-60 mm (Racotta *et al.*, 2003), tallas similares a la de los organismos utilizados en el presente estudio. Los datos de biomasa y peso de la gónada en el presente estudio, indicaron que la maduración

gonádica afectó los análisis de expresión génica en los organismos interferidos, tanto con RNAi-*gapdh* como de RNAi-*mstn*, ya que cuando se consideró el efecto de la maduración de la gónada se observó que sí ocurrió una disminución en ambos transcritos interferidos, *mstn* y *gapdh*, y en ambas concentraciones de dsRNA evaluadas. Adicionalmente se registró mortalidad en ambos grupos interferidos, mientras que el grupo control que solo fue inyectado con solución salina no presentó mortalidad, indicando que los animales no murieron por el estrés causado por la manipulación ni por el daño causado por la microinyección.

Los trabajos existentes en moluscos utilizando la herramienta del RNAi reafirman los resultados encontrados en el presente estudio, ya que otros autores han logrado un silenciamiento post-transcripcional de los genes interferidos con dsRNA o siRNA, inferido a través de la inhibición del mRNA y en algunos casos a nivel de proteína (ver Sección 2.2.1); sin embargo, los resultados han sido variables, por ejemplo, el efecto ha sido transitorio o durable, específico o inespecífico, sistémico en algunos casos, dosis dependiente en otros y con diferentes porcentajes de silenciamiento.

La permeabilización de la célula por medio de electroporación (Terova *et al.*, 2013) fue probablemente un factor importante para la entrega eficiente del dsRNA en el órgano blanco, en este caso el músculo, órgano principal donde se expresa la *mstn* en moluscos pectínidos como *Argopecten purpuratus* (Morales-Collío *et al.*, 2014), *Argopecten irradians* (Kim *et al.*, 2004), *Chlamys farreri* (Hu *et al.*, 2010) y *Nodipecten subnodosus* (Morelos *et al.*, 2015).

La cantidad de dsRNA fue seleccionada con base en los estudios realizados en moluscos, para los cuales dependiendo de la especie y los niveles de expresión esperados para cada gen, las cantidades han oscilado desde 0.1 µg (Jiang *et al.*, 2006) hasta 160 µg (Fang *et al.*, 2011). Se sabe además que niveles excesivos de RNAs exógenos pueden saturar uno o más componentes de las vías de RNAi endógenas, causando toxicidad y mortalidades en los animales (Scherer y Rossi, 2003; Snove y Rossi, 2006).

En el caso particular del experimento de RNAi-*mstn*, se consideró la información existente sobre el nivel de expresión del gen de la *miostatina*, el cual es relativamente bajo según diversos estudios, incluyendo los realizados con *N. subnodosus* (Morelos *et al.*, 2015). Las concentraciones evaluadas para interferir la expresión de la *mstn* (5 y 30 μg) fueron similares a otros estudios de interferencia génica en moluscos (Jiang *et al.*, 2006; Fabioux *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2011; Jiao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Huvet *et al.*, 2015), sin embargo no mostraron diferencias entre ellas.

A pesar de que sí se observó una interferencia parcial del transcrito de la *mstn*, los resultados de los análisis histológicos para determinar si hubo hipertrofia e hiperplasia resultante de la inhibición del transcrito de la *mstn* no mostraron una diferencia en el tamaño y número de fibras musculares, entre el control salino y las dos concentraciones de dsRNA evaluadas (5 y 30 μg). En el análisis de hipertrofia se encontraron diferencias significativas entre muestreos, mostrando una reducción en el tamaño de las fibras musculares; sin embargo, en el análisis de hiperplasia se encontraron diferencias significativas entre el inicio y final del experimento, con un incremento del número de fibras musculares al final del experimento pero sin diferencias significativas entre concentraciones. Es probable que la duración del experimento no haya sido lo suficientemente larga para observar un crecimiento significativo en el músculo aductor como resultado de una inhibición de la expresión de la *mstn*.

Para desencadenar el efecto de RNAi se requiere resolver diversos problemas asociados, uno de ellos es la respuesta inmune innata, otro es evitar la saturación de vías endógenas de micro RNAs (miRNAs), así como efectos colaterales. Estos efectos pueden ser causados por varios factores, incluyendo la región de la secuencia utilizada, el tamaño y cantidad de la molécula efectora, el tipo de entrega y las células blanco (Takahashi *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2013). Es importante mencionar que se pudo comprobar en el grupo control negativo (solución salina) que el efecto de la electroporación no fue causante de mortalidad.

La proteína glucolítica Gapdh involucrada en el metabolismo de los glúcidos para la producción de energía es considerada de vital importancia para la homeostasis de los

organismos. El aumento de esta enzima se ha visto asociado con la proliferación celular y se sabe que interactúa con una gran cantidad de moléculas, entre ellas proteínas, diferentes tipos de RNA y DNA telomérico; también posee una actividad catalítica en condiciones de estrés oxidativo que puede dirigir al envejecimiento celular y apoptosis (Nicholls *et al.*, 2012). La localización de esta enzima también le atribuye diferentes funciones; por ejemplo, su expresión prominente en el citoplasma le permite funcionar de manera eficiente como un sensor intracelular el cual, por la vía post-transcripcional o cambios estructurales, es capaz de activar otras vías para mantener la homeostasis celular. Su presencia en diferentes compartimentos intracelulares, principalmente en el citoesqueleto, la mitocondria y el núcleo además del citoplasma, indica que esta enzima tiene diferentes funciones asociadas al mantenimiento de múltiples niveles la homeostasis (Tristan *et al.*, 2011).

El silenciamiento del transcrito de *gapdh* se utilizó como control positivo en el experimento de silenciamiento génico de la *mstn*. Por ejemplo, en un estudio realizado en camarones para silenciar el gen ortólogo de la *mstn* (*mstn/gdf11*) se utilizó un control positivo (β -actina) y los animales murieron de 2-4 días post-inyección, indicando la efectividad de la introducción y silenciamiento por parte de la dsRNA (De Santis *et al.*, 2011). En otros estudios realizados en moluscos se utilizaron controles positivos de genes endógenos para confirmar el silenciamiento pero ninguno fue letal para los organismos (Fang *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2006; Knight *et al.*, 2011), lo cual podría indicar que la cantidad inyectada no fue suficiente para inducir a la mortalidad, o que el sistema endógeno de silenciamiento génico en moluscos es poco efectivo. Sin embargo, la bibliografía existente en moluscos no sugiere un sistema poco efectivo. Otro estudio donde se silenció el gen de interés (*mstn*) utilizó este gen (*gapdh*) en ratones como control positivo, en el cual se aplicó siRNA específico para *gapdh* en cultivos celulares, encontrando que la inhibición no fue total y la concentración más alta apenas mostró una ligera inhibición (Magee *et al.*, 2006). Por último, en un estudio realizado con lobina (*Dicentrarchus labrax*) y el gen de la *mstn*, se utilizó como control positivo shRNA (short hairpin RNA) dirigido a *gapdh*, cada dos semanas durante un periodo de ocho semanas; el estudio no evaluó mortalidad pero se

infirió que no hubo un efecto deletéreo ya que los organismos de este control positivo ganaron peso (Terova *et al.*, 2013).

Los trabajos anteriores coinciden parcialmente con nuestros resultados, excepto que el efecto de la interferencia de *gapdh* sobre el incremento en las variables biométricas evaluadas sí puede observarse en el peso de la gónada, el cual fue significativamente menor en ambos grupos interferidos a diferencia de lo observado para el peso de la gónada en los experimentos de interferencia de *egfp* y *mstn*, donde no se encontró una diferencia significativa entre el grupo control y los dos grupos interferidos. Es probable que la cantidad inyectada de dsRNA-*gapdh* no fuese suficiente para causar la muerte de todos los organismos, lo cual puede deberse a la alta expresión esperada de este gen además de que la proteína ya existente posiblemente permitió que los organismos se recuperaran del potencial efecto causado por la inyección de la dsRNA.

Así como el uso de controles positivos es importante, es necesario utilizar controles negativos además de los grupos control, donde la utilización de secuencias no presentes en el organismo de estudio colaboran con la confiabilidad del experimento. El uso de secuencias que no están presentes en el genoma de los organismos han sido reportadas en diferentes estudios con moluscos, siendo ya sea el gen o la proteína eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) la que ha sido utilizada previamente como control negativo (Fang *et al.*, 2011; Hanington *et al.*, 2010; Jee *et al.*, 2014; Jiao *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2001; Oyanadel *et al.*, 2016; Suzuki *et al.*, 2009; You *et al.*, 2012) sin encontrar un efecto en los organismos, lo cual difiere de este trabajo ya que *egfp* provocó mortalidades en ambos grupos, producto probablemente de efectos off-target o de cierta toxicidad.

Los efectos off-target son producidos cuando los siRNA degradan mensajeros de genes que no pretendían ser silenciados y esto puede complicar la interpretación de los efectos observados (Federov *et al.* 2009). A la fecha, existen varios trabajos publicados indicando efectos off-target causados a consecuencia de la unión inespecífica de los siRNA con otros genes diferentes al gen blanco, o al interferir con la acción de los miRNAs. Estos efectos pueden ser dependientes o independientes de la secuencia, por ejemplo, en un estudio

realizado en embriones de peces cebra donde se inyectó dsRNA del gen *T-box (tbx16/spt)*, Oates *et al.* (2000) muestran una reducción en mensajeros endógenos causada por la introducción del dsRNA independiente de su secuencia, por lo que sugieren tener precaución en la interpretación de los resultados en los experimento de interferencia. Otro estudio coincide con el anterior, al reportar un efecto de interferencia no-específica en embriones de pez cebra, registrando fenotipos defectuosos independientes de la secuencia, además de que la toxicidad mostrada fue dosis dependiente (Zhao *et al.*, 2001).

9. CONCLUSIONES

A pesar de que se observó un crecimiento en biomasa y en el peso de gónada en el periodo evaluado de 30 días, no se observó un incremento en la masa muscular, así como tampoco una hipertrofia o hiperplasia como resultado de la interferencia. Esto deberá ser evaluado a futuro utilizando diferentes dosis y tiempos experimentales más largos.

Los análisis estadísticos deben considerar cualquier covariable que pueda afectar la expresión génica, como fue en este caso la maduración gonadal.

Una vez que se incluyó el peso de gónada como covariable, la interferencia génica tanto de *gapdh* como de la *mstn* resultó en una reducción de los niveles de expresión de ambos genes.

A futuro será importante evaluar la interferencia génica de la *mstn* en organismos juveniles con el fin de evitar los posibles efectos de la maduración gonádica sobre la expresión de este gen.

Se sugiere evaluar otras dosis u otro gen como control negativo debido a que de las concentraciones usadas de dsRNA-*egfp* la más alta mostró efectos deletéreos.

Es importante determinar la función de la *Mstn* tanto en el desarrollo del músculo esquelético como en otros órganos, ya que en pectínidos el transcrito de la *mstn* se expresa en diversos tejidos.

10.- LITERATURA CITADA

- Acosta, J., Y. Carpio, I. Borroto, O. González, M.E. Estrada. 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J Biotechnol.* 119:324-331.
- Amirouche, A., A. Derieux, S. Banzet, N. Koulmann, R. Bonnefoy, C. Mouret, X. Bigard, A. Peinnequin, D. Freyssenet. 2009. Down-Regulation of Akt/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway in Response to Myostatin Overexpression in Skeletal Muscle. *Endocrinology.* 150(1):286-294.
- Badii, S.N., J. Castillo, A. Wong. 2008. Uso de Análisis de Covarianza (ANCOVA) en investigación científica. *InOovaciOnes de Negocios.* 5(1):25-38.
- Baeza-García, A., R.J. Pierce, B. Gourbal, E. Werkmeister, D. Colinet, J.M. Reichhart, C. Dissous, C. Coustau. 2010. Involvement of the Cytokine MIF in the Snail Host Immune Response to the Parasite *Schistosoma mansoni*. *PLOS Pathog.* 6(9):1-16.
- Bindu, K.A., A. Raveendran, S. Antony, K.V. Raghunandan. 2011. Association of myostatin gene (MSTN) polymorphism with economic traits in rabbits. En: Pérez-Cabal, M.A., Gutiérrez, J.P., Cervantes, I., Alcalde, M.A. (eds.) *Fibre production in South American camelids and other fibre animals.* Wageningen Academic Publishers. First published. The Netherlands. 3 p.
- Bustin, S.A., V. Benes, J.A. Garson, J. Hellems, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandosempele, C.T. Wittwer. 2009. The MIQE Guidelines: *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.* *Clin Chem.* 55(4):611-622.
- Caplen, N.J., S. Parrish, F. Imani, A. Fire, R.A. Morgan. 2001. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *PNAS.* 98(17):9742-9747.

- Chantler, P.D. 2006. Scallop adductor muscle: Structure and function. En: Shumway, S.E. & Parsons, G.J. (eds.) *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier. Amsterdam. 69 p.
- Cisneros-Mata, M.A. 2010. The importance of fisheries in the Gulf of California and ecosystem-based sustainable co-management for conservation. En: Brusca R. (ed.) *The Gulf of California Biodiversity and Conservation*. The University of Arizona Press. U.S.A. 16 p.
- Covi, J.A., K. Hyun-Woo, D.L. Mykles. 2008. Expression of alternatively spliced transcripts for a myostatin-like protein in the blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*. *Comp Biochem Physiol A*. 150:423-430.
- De la Rosa-Reyna, X.F., M.A. Rodríguez Pérez, A.M. Sifuentes-Rincón. 2006. Microsatellite polymorphism in intron 1 of the bovine myostatin gene. *J Appl Genet*. 47(1):1-3.
- De Santis, C., N.M. Wade, D.R. Jerry, N.P. Preston, B.D. Glencross, M.J. Sellars. 2011. Growing backwards: an inverted role for the shrimp ortholog of vertebrate myostatin and GDF11. *J Exp Biol*. 214:2671-2677.
- Dominique, J., C. Gérard. 2006. Myostatin regulation of muscle development: Molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp Cell Res*. 312:2401-2414.
- Elliot, B., D. Renshaw, S. Getting, R. Mackenzie. 2012. Review The central role of myostatin in skeletal muscle and whole body homeostasis. *Acta Physiol*. 205:324-340.
- Fabioux, C., C. Corporeau, V. Quillen, P. Favrel, A. Huvet. 2009. *In vivo* RNA interference in oyster –*vasa* silencing inhibits germ cell development. *FEBS J*. 276:2566-2573.

- Fang, D., G. Xu, Y. Hu, C. Pan, L. Xie, R. Zhang. 2011. Identification of genes directly involved in shell formation and their functions in pearl oyster, *Pinctada fucata*. PLoS ONE. 6(7):1-13.
- Federov, Y., E.M. Anderson, A. Birmingham, A. Reynolds, J. Karpilow, K. Robinson, D. Leake, W.S. Marshall, A. Khvorova. 2006. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. RNA. 12:1188-1196.
- Félix-Pico, E.F. 2006. México. En: Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Shumway, S.E. & Parsons, G.J. (eds.) Elsevier. Amsterdam. 53 p.
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 391:806-811.
- Fontanesi, L., M. Tazzoli, E. Scotti, V. Russo. 2008. ANALYSIS OF CANDIDATE GENES FOR MEAT PRODUCTION TRAITS IN DOMESTIC RABBITS BREEDS. Genetics. 10(13):79-84.
- Funkenstein, B., E. Olekh. 2010. Growth/differentiation factor-11: an evolutionary conserved growth factor in vertebrates. Dev Genes Evol. 220:129-137.
- Grimaldi, A., G. Tettamani, L. Rinaldi, M.F. Brivio, D. Castellani, M. de Eguileor. 2004. Muscle differentiation in tentacles of *Sepia officinalis* (Mollusca) is regulated by muscle regulatory factors (MRF) related proteins. Develop Growth Differ. 46:83-95.
- Grobet, L., L.J. Royo-Martin, D. Poncelet, D. Pirottin, B. Brouwers, J. Riquet, A. Schoeberlein, S. Dunner, F. Ménissier, J. Massabanda, R. Fries, R. Hanset, M. Georges. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. Nat Genet. 17:71-74.

- Gronevik, E., F. Vult von Steyern, J. Magne Kalhovde, T.E. Tjelle, I. Mathiesen. 2005. Gene expression and immune response kinetics using electroporation-mediated DNA delivery to muscle. *J Gene Med.* 7:218-227.
- Guo, L., L. Li, S. Zhang, G. Zhang. 2012. Molecular cloning and characterization of the myostatin gene in a cultivated variety of bay scallop, *Argopecten irradians*. *Aquaculture.* 350-353:192-199.
- Hanington, P.C., M.A. Forys, J.W. Dragoo, S. Zhang, C.M. Adema, E.S. Loker. 2010. Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection. *PNAS.* 107(49):21087-21092.
- Hannon, G.J. 2002. RNA interference. *Nature.* 418:244-251.
- Hashimoto, N., Y. Kurita, H. Wada. 2012. Developmental role of *dpp* in the gastropod shell plate and co-option of the *dpp* signaling pathway in the evolution of the operculum. *Dev Biol.* 366:367-373.
- Hellemans, J. G. Mortier, A. De Paepe, F. Speleman, J. Vandesompele. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8(2):R19-R19.14.
- Helliwell, C.A., P. Waterhouse. 2005. Constructs and Methods for Hairpin RNA-Mediated Gene Silencing in Plants. En: Engelke, D.R. & Rossi, J. (eds.) *Methods in Enzymology.* Elsevier. San Diego, California. 11 p.
- Hill, J.J., M.V. Davies, A.A. Pearson, J. H. Wang, R. M. Hewick, N.M. Wolfman, Y. Qiu. 2002. The Myostatin Propeptide and the Follistatin-related Gene Are Inhibitory Binding Proteins of Myostatin in Normal Serum. *J Biol Chem.* 277(43):40735-40741.
- Holguín-Quiñones, O.E., F. García-Domínguez. 2011. Sistemática y características biogeográficas de *Nodipecten subnodosus* (SOWERBY, 1835) y *N. nodosus* (LINNAEUS, 1758) (MOLLUSCA: BIVALVIA: PECTINIDAE). Maeda-

- Martínez, A.N. & Lodeiros-Seijo, C. (eds.) *Biología y Cultivo de los Moluscos Pectínidos del Género Nodipecten*. Editorial Limusa. México, D.F. 9 p.
- Hu, X., H. Guo, Y. He, S. Wang, L. Zhang, S. Wang, X. Huang, S. William Roy, W. Lu, J. Hu, Z. Bao. 2010. Molecular characterization of *Myostatin* gene from zhikong scallop *Chlamys farreri* (Jones et Preston 1904). *Genes Genet Syst.* 85:207-218.
- Huang, Z., X. Chen, D. Chen. 2011. Review Myostatin: A novel insight into its role in metabolism, signal pathways, and expression regulation. *Cell Signal.* 23:1441-1446.
- Humason, G.L. 1979. *ANIMAL TISSUE TECHNIQUES*. Freeman and Company. 4ta edición. San Francisco. USA. 641 pp.
- Huvet, A., E. Fleury, C. Corporeau, V. Quillien, J.Y. Daniel, G. Riviere, P. Boudry, C. Fabioux. 2011. In vivo RNA Interference of a Gonad-Specific Transforming Growth Factor- β in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol.* 14:402-410.
- Huvet, A., J. Béguel, N. P. Cavaleiro, Y. Thomas, V. Quillien, P. Boudry, M. Alunno-Bruscia, C. Fabioux. 2015. Disruption of amylase genes by RNA interference affects reproduction in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Exp Biol.* 218:1740-1747.
- Ibarra, A.M., C. Alfonsi, J.E. Pérez. 2011. Genética y Biotecnologías para el Mejoramiento del Cultivo y la Conservación del Recurso *Nodipecten* spp. En: Maeda-Martinez A.N. & Lodeiros-Seijo, C. (eds.) *Biología y Cultivo de los Moluscos Pectínidos del Género Nodipecten*. Editorial Limusa. México. 13 p.
- Ibarra, A.M., J.L. Petersen, T.R. Famula, B. May. 2006. Characterization of 35microsatellite loci in the Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and their cross-species amplification in four other scallops of the Pectinidae family. *Mol Ecol Notes.* 6:153-156.

- Jee, B.Y., M.S. Kim, M.Y. Cho, S.J. Lee, M.A. Park, J.W. Kim, S.H. Choi, H.D. Jeong, K.H. Kim. 2014. Simultaneous and Systemic Knock-down of Big Defensin 1 and 2 gene Expression in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* using Long Double-stranded RNA-mediated RNA Interference. *Fish Aquat Sci.* 17(3):377-380.
- Jiang, Y., E.S. Loker, S. Zhang. 2006. In vivo and in vitro knockdown of *FREP2* gene expression in the snail *Biomphalaria glabrata* using RNA interference. *Dev Comp Immunol.* 30:855-866.
- Jiao, Y., H. Wang, X. Du, X. Zhao, Q. Wang, R. Huang, Y. Deng. 2012. Dermatopoint, a shell matrix protein gene from pearl oyster *Pinctada martensii*, participates in nacre formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 425:679-683.
- Kavi, H.H., H. Fernandez, W. Xie, J.A. Birchler. 2008. Genetics and Biochemistry of RNAi in *Drosophila*. En: Paddison, P.J. & P.K. Vogt (eds.) *Currents Topics in Microbiology and Immunology. RNA Interference*. Editorial Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 30 p.
- Kim, H. D. L. Mykles, F.W. Goetz, S.B. Roberts. 2004. Characterization of a myostatin-like gene from the bay scallop, *Argopecten irradians*. *Biochim Biophys Acta.* 1679:174-179.
- Kim, H., H.K. Kim, M.S. Yoo. 2007. Characterization of a Myostatin-like Gene from the Scallop *Patinopecten yessoensis*. *J Fish Sci Technol.* 10(1):16-23.
- Kim, K.S., Y. Kim, J.M. Jeon, Y.S. Kang, Y.S. Kang, C.W. Oh, H. Kim. 2010. Molecular characterization of myostatin-like genes expressed highly in the muscle tissue from Morotoge shrimp, *Pandalopsis japonica*. *Aquac Res.* 41:e862-871.
- Knight, M., A. Miller, Y. Liu, P. Scaria, M. Woodle, W. Ittiprasert. 2011. Polyethyleneimine (PEI) Mediated siRNA Gene Silencing in the *Schistosoma mansoni* Snail Host, *Biomphalaria glabrata*. *PLoS Neglect Trop D.* 5(7):1-10.

- Korneev, S.A., I. Kemenes, V. Straub, K. Staras, E.I. Korneeva, G. Kemenes, P.R. Benjamin, M. O'Shea. 2002. Suppression of Nitric Oxide (NO)-Dependent Behavior by Double-Stranded RNA-Mediated Silencing of a Neuronal NO Synthase Gene. *J Neurosci.* 22(RC227):1-5.
- Lee, J., H. Kim, K. Kim, J. Han, Y. Lee, C. Lim, D. Chang, T. Kubo, B. Kaang. 2001. Overexpression of and RNA Interference with the CCAAT Enhancer-Binding Protein on Long-Term Facilitation of *Aplysia* Sensory to Motor Synapses. *Learn Memory.* 8:220-226.
- Lee, J., J. Momani, Y.M. Kim, C. Kang, J. Choi, H. Baek, H. Kim. 2015. Effective RNA-silencing strategy of Lv-MSTN/GDF11 gene and its effects on the growth in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comp Biochem Phys B.* 179:9-16.
- Lee, S. 2004. Regulation of Muscle Mass by Myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:61-86.
- Lee, S., A. McPherron. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *PNAS.* 38 (16):9306-9311.
- Levine, D.M., T.C. Krehbiel, M.L. Berenson. 2006. Estadística para administración. Editorial Pearson. 4ta edición. México. 580 p.
- Lima, P.C., J.O. Harris, M. Cook. 2013. Exploring RNAi as a therapeutic strategy for controlling disease in aquaculture. *Fish Shellfish Immun.* 34:729-743.
- Llera-Herrera, R., A. García-Gasca, C. Abreu-Goodger, A. Huvet, A.M. Ibarra. 2013. Identification of male gametogenesis expressed genes from the scallop *Nodipecten subnodosus* by suppressive subtraction hybridization and pyrosequencing. *PLoS ONE.* 8(9):1-15.
- Lluch-Cota, S.E., E.A. Aragón-Noriega, F. Arreguín-Sánchez, D. Auriol-Gamboa, J.J. Bautista-Romero, R.C. Brusca, R. Cervantes-Duarte, R. Cortés-Altamirano, P. Del-Monte-Luna, A. Esquivel-Herrera, G. Fernández, M.E. Hendrickx, S.

- Hernández-Vázquez, H. Herrera-Cervantes, M. Kahru, M. Lavín, D. Lluch-Belda, D.B. Lluch-Cota, J. López-Martínez, S.G. Marinone, M.O. Nevárez-Martínez, S. Ortega-García, E. Palacios-Castro, A. Parés-Sierra, G. Ponce-Díaz, M. Ramírez-Rodríguez, C.A. Salinas-Zavala, R.A. Schwartzlose, A. Sierra-Beltrán. 2007. The Gulf of California: Review of ecosystem status and sustainability challenges. *Prog Oceanogr.* 73:1-26.
- MacLea, K.S., J.A. Covi, H. Kim, E. Chao, S. Medler, E.S. Chang, D.L. Mykles. 2010. Myostatin from the America lobster, *Homarus americanus*: Cloning and effects of molting on expression in skeletal muscles. *Comp Biochem Phys A.* 157:328-337.
- Magee, T. R., J. N. Artaza, M.G. Ferrini, D. Vernet, F.I. Zuniga, L. Cantini, S. Reisz-Porszasz, J. Rajfer, NF. Gonzalez-Cadavid. 2006. Myostatin short interfering hairpin RNA gene transfer increases skeletal muscle mass. *J Gene Med.* 8:1171-1181.
- Maldonado-Amparo, R., J.L. Ramírez, S. Ávila, A.M. Ibarra. 2003. Triploid lion-paw (*Nodipecten subnodosus* Sowerby); growth, gametogenesis, and gametic cell frequencies when grown at a high food availability site. *Aquaculture.* 235:185-205.
- Maldonado-Amparo, R., J.L. Ramírez, S. Ávila, A.M. Ibarra. 2004. Triploid lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby); growth, gametogenesis, and gametic cell frequencies when grown at high food availability site. *Aquaculture.* 235:185-205.
- McPherron, A.C., A.M. Lawler, S. Lee. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature.* 387:83-90
- McPherron, A.C., S. Lee. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci.* 94:12457-12461.

- Morales-Collío, K., V. Valenzuela-Muñoz, C. Gallardo-Escárate. 2014. The Myostatin gene of *Argopecten purpuratus* (APMSTN): transcript expression and single-nucleotide polymorphism differences between wild and hatchery-breed populations. *J Mollus Stud.* 80:169-176.
- Morelos, R.M., J.L. Ramírez, A. García-Gasca, A.M. Ibarra. 2015. Expression of the myostatin gene in the adductor muscle of the Pacific Lion-Paw scallop *Nodipecten subnodosus* in association with growth and environmental conditions. *J Exp Zool.* 323A:239-255.
- Nicholls, C., H. Li, J. Liu. 2012. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. *Clin Exp Pharmacol P.* 39:674-679.
- Núñez-Acuña, G., C. Gallardo-Escárate. 2014. The myostatin gene of *Mytilus chilensis* evidences a high level of polymorphism and ubiquitous transcript expression. *Gene.* 536:207-212.
- Oates, A.C., A.E.E. Bruce, R. K. Ho. 2000. Too Much Interference: Injection of Double-Stranded RNA Has Nonspecific Effects in the Zebrafish Embryo. *Dev Biol.* 224:20-28.
- Oyanadel, D., R. Gonzalez, P. Flores-Herrera, K. Brokordt, R.D. Rosa, L. Mercado, P. Schmitt. 2016. Molecular characterization of an inhibitor of NF- κ B in the scallop *Argopecten purpuratus*: First insights into its role on antimicrobial peptide regulation in a mollusk. *Fish Shellfish Immun.* 52:85-93.
- Peña, J. B. 2001. Taxonomía, morfología, distribución y hábitat de los pectínidos Iberoamericanos. En: Maeda-Martínez, A.N. (ed.) Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. Editorial Limusa, México, D.F. 25 p.
- Petersen, J.L., A.M. Ibarra, B. May. 2009. Thirty-seven additional microsatellite loci in the Pacific lion-pawn scallop (*Nodipecten subnodosus*) and cross-amplification in other pectinids. *Conservation Genet Resour.* 1:101-105.

- Petersen, J.L., A.M. Ibarra, B. May. 2010. Nuclear and mtDNA lineage diversity in wild and cultured Pacific lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus* (Baja California Peninsula, México). *Mar Biol.* 157:2751-2767.
- Petersen, J.L., A.M. Ibarra, J.L. Ramírez, B. May. 2008. An induced mass spawn of the hermaphroditic lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*: genetic assignment of maternal and paternal parentage. *J Hered.* 99(4):337-348.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9 00):2003-2007.
- Pfaffl, M.W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. En: Bustin, S.A. (ed.) A-Z of quantitative PCR. International University Line (IUL). Primera edición. La Jolla, CA, USA. 25 p.
- Ponce-Díaz, G., A. Massó-Rojas, E. F. Félix-Pico, M.V. Morales-Zarate, N. García, C. Lodeiros-Seijo, S.E. Lluch-Cota. 2011. *Nodipecten spp.* como recurso pesquero. En: Maeda-Martínez, A.N. & Lodeiros-Seijo, C. (eds.) *Biología y Cultivo de los Moluscos Pectínidos del Género Nodipecten*. Editorial Limusa. México, D.F. 15 p.
- Qian, Z., X. Mi, X. Wang, S. He, Y. Liu, F. Hou, Q. Liu, X. Liu. 2013. cDNA cloning and expression analysis of myostatin/GDF11 in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comp Biochem Phys A.* 165:30-39.
- Racotta, I.S., E. Palacios, A.M. Ibarra, J.L. Ramírez, F. Arcos, O. Arjona. 2008. Comparative biochemical composition of ploidy groups of the lion-pawn scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby) supports the physiological hypothesis for the lack of advantage in triploid mollusc's growth in food-rich environments. *Mar Biol.* 153:1245-1256.

- Racotta, I.S., J.L. Ramírez, A.M. Ibarra, M.C. Rodríguez-Jaramillo, D. Carreño, E. Palacios. 2003. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. *Aquaculture*. 217:335-349.
- Ramírez-Arce, J.L. 2009. Evaluación de la ventaja productiva y grado de esterilidad en triploides de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby 1835) como alternativa para el cultivo en el parque nacional Bahía de Loreto, Golfo de California. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. 94 p.
- Rodino-Kaplan, L.R., A.M. Haidet, J. Kota, C. Handy, B.K. Kaspar, J.R. Mendell. 2009. Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. *Muscle Nerve*. 39:283-296.
- Roman, G., G. Martínez, O. García, L. Freites. 2001. Reproducción. En: Maeda-Martínez, A.N. (ed.) *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. Editorial Limusa, México, D.F. 32 p.
- Sifuentes-Romero, I., S.L. Milton, A. García-Gasca. 2011. Post-transcriptional gene silencing in non-mammalian vertebrate systems: Where do we stand?. *Mutat Res*. 728:158-171.
- Snove Jr, Ola. J.J. Rossi. 2006. Toxicity in mice expressing short hairpin RNAs gives new insight into RNAi. *Genome Biol*. 7(8):231.1-231.5.
- Suzuki, M., K. Saruwatari, T. Kogure, Y. Yamamoto, T. Nishimura, T. Kato, H. Nagasawa. 2009. An Acidic Matrix Protein, Pif, Is a Key Macromolecule for Nacre Formation. *Science*. 325:1388-1390.
- Takahashi, Y., M. Nishikawa, Y. Takakura. 2009. Nonviral vector-mediated RNA interference: Its gene silencing characteristics and important factor to achieve RNAi-based gene therapy. *Adv Drug Deliver Rev*. 760-766.

- Terova, G., S. Rimoldi, G. Bernardi, M. Saroglia. 2013. Inhibition of Myostatin Gene Expression in Skeletal Muscle of Fish by In Vivo Electrically Mediated dsRNA and shRNAi Delivery. *Mol Biotechnol.* 54:673-684.
- Tristan, C., N. Shahani, T.W. Sedlak, A. Sawa. The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments. *Cell Signal.* 23:317-323.
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 *Nucleic Acids Research* 35: W71-W74
- van Diapen, M.T., G.E. Spencer, J. van Minnen, Y. Gouwenberg, J. Bouwman, A.B. Smit, R.E. van Kesteren. The molluscan RING-finger protein L-TRIM is essential for neuronal outgrowth. *Moll Cell Neurosci.* 29:74:81.
- Wang, M., J. Yang, Z. Zhou, L. Qiu, L. Wang, H. Zhang, Y. Gao, X. Wang, L. Zhang, J. Zhao, L. Song. 2011. A primitive Toll-like receptor signaling pathway in mollusk Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Dev Comp Immunol.* 35:511-520.
- Wang, X., X. Song, T. Wang, Q. Zhu, G. Miao, Y. Chen, X. Fang, H. Que, L. Li, G. Zhang. 2012. Evolution and functional analysis of the *Pif97* gene of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Curr Zool.* 59(1):109-115.
- Xie, F., P. Xiao, D. Chen, L. X., B. Zhang. 2012. miRDeep Finder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol.* 80:75-84.
- You, Y., P. Huan, B. Liu. 2012. RNAi assay in primary cells: a new method for gene function analysis in marine bivalve. *Mol Biol Rep.* 39:8209-8216.
- Zhao, Z., Y. Cao, M. Li, A. Meng. 2001. Double-Stranded RNA Injection Produces Nonspecific Defects in Zebrafish. *Dev Biol.* 229:215-223.

11. ANEXOS

ANEXO I

Ligación con el vector pGEM-T Easy Vector

1. - Se prepara la siguiente reacción en el orden indicado:

| | |
|--------------------------|---------------|
| Buffer 2x ligation | 2.5µl |
| pGEM-T Easy Vector | 0.5 µl |
| H ₂ O Milli Q | 1 µl |
| Producto de PCR | 0.5 µl |
| DNA ligasa (T4) | <u>0.5 µl</u> |
| Total | 5 µl |

2. - Se incuba a 4 °C durante toda la noche

ANEXO II

Transformación de ligación con el vector pGEM-T Easy Vector

1. - Poner cajas de petri con medio LB-Agar con ampicilina a 37 °C.
2. - Descongelar bacterias *E. coli* JM109 en hielo.
3. - Mezclar 2 µl de ligación en 50 µl de bacterias.
4. - Incubar en hielo 20 minutos.
5. - Dar un shock térmico a 42 °C en baño maría por 50 s
6. - Incubar en hielo 2 min.
7. - Agregar 250 µl de Medio SOC.
8. - Transferir a un tubo para centrifuga.
9. - Incubar 90 minutos con agitación a 37 °C.
10. - Inocular dos cajas de Petri con LB-Agar, las cuales previamente se agregaron 40 µl de X-Gal y 7 µl de IPTG.
11. - Incubar toda la noche a 37 °C.

Levantamiento de colonias

- 1.- Preparar medio LB con ampicilina (2.4 µl de ampicilina por 1 ml de LB).
- 2.- Distribuir en tubos de ensaye 3 ml de medio LB con ampicilina.
- 3.-Levantar las colonias positivas más aisladas con un palillo de madera estéril y colocar en los tubos.
4. - Incubar a 37 °C con agitación a 240 rpm 18 horas.

ANEXO III

Lisis alcalina

1. - Transferir 1.5 ml a un tubo eppendorf.
2. - Centrifugar 1 min a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante completamente.
3. - Agregar 100 µl de *Cell resuspension solution* (50 mM Tris-HCl pH 8.0: 10 mM EDTA pH 8.0: 80 µg de *RNasa*) y resuspender el pellet.
4. - Agregar 100 µl de buffer de lisis 200 mM NaOH y SDS 1 % (preparar en el momento a partir de soluciones 400 mM NaOH y SDS 2%; medio volumen de cada una).
5. - Agregar 120 µl de buffer de neutralización (Acetato de potasio 3 M pH 5.5; ajustar pH con ácido acético) y mezclar por 3 minutos.
6. - Centrifugar 1 min a máxima velocidad y transferir sobrenadante a un tubo nuevo.
7. - Agregar 200 µl de isopropanol y mezclar.
8. - Centrifugar por 1 minuto a máxima velocidad y descartar sobrenadante.
9. - Agregar 500 µl de etanol al 70 % y mezclar.
10. - Centrifugar por 1 minuto a máxima velocidad y descartar sobrenadante, volver a centrifugar y eliminar sobrenadante con punta.
11. - Agregar 25 µl de H₂O estéril y re suspender el pellet.

Anexo IV

Extracción de RNA

1. - Agregar 800 µl de TriPure a un tubo de 1.6 ml previamente esterilizado.
2. - Agregar 100 µg de perlas de vidrio estériles.
3. - Colocar ~100 mg de tejido previamente enjuagado con agua Milli Q para eliminar restos de RNA later. Colocar en hielo.
4. - Homogenizar el tejido con un macerador mecánico estéril, posteriormente en un homogenizador de tejidos Fast- Prep (MP BIOMEDICALS) (2 ciclos oscilatorios de 60 segundos, Velocidad 6.0 m/s).
5. - Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
6. - Transferir la fase superior a un tubo nuevo de 1.6 ml.
7. - Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
8. - Agregar 300 µl de cloroformo a la muestra y mezclar durante 10 segundos.
9. - Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
10. - Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
11. - Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo de 1.6 ml estéril (procurando no tocar la fase intermedia).
12. - Adicionar 500 µl de etanol absoluto, invertir el tubo varias veces e incubar a -20 °C durante 30 minutos.
13. - Centrifugar a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
14. - Descartar sobrenadante por decantación.
15. - Lavar el pellet con 500 µl de etanol al 75%. Incubar en hielo por 10 minutos.

16. - Centrifugar a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
17. - Repetir los pasos 15 y 16.
18. - Descartar el etanol y secar a temperatura ambiente.
19. - Resuspender el RNA en 30 µl de agua MilliQ.
20. - Almacenar a -20°C.

Anexo V

Digestión con DNasa

1. - Colocar 7 µg de RNA en un tubo estériles de 1.6 ml.
2. - Agregar 7 µl de la siguiente reacción a cada tubo:

| | |
|----------------|---------------|
| RQ1 DNase | 5 µl |
| RQ1 Buffer 1 X | 1.5 µl |
| RNasin | <u>0.5 µl</u> |
| Total | 7 µl |

3. - Se agregó agua Milli Q a cada muestra para llevar a cada muestra a un volumen de 20 µl.
4. - Se incubó a 37 °C durante 1 hora.
5. - Se agregó 1 µl de RQ1 DNase Stop Solution y se incubó a 65 °C durante 10 minutos.
6. - Se almacena a -20 °C.

Anexo VI

Síntesis de cDNA

1. - Agregar a cada muestra 2 µl de Oligo dT
2. - Colocar 4 µg de RNA libre de DNA genómico en tubos de 0.2 ml.
3. - Agregar 16.5 µl de la siguiente reacción a cada tubo:

| | |
|---|---------------|
| ImProm-II TM Reverse Transcriptasa | 2 µl |
| ImProm-II TM 5X Reaction Buffer | 8 µl |
| MgCl ₂ | 4 µl |
| dNTP's | 2 µl |
| RNasin | <u>0.5 µl</u> |
| Total | 16.5 µl |

- 4.- Se incuba esta reacción 10 minutos a 25 °C, 60 minutos a 42 °C y 10 minutos a 70 °C
5. - Se almacena a -20 °C.