



**UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

ESCUELA DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA

**"AMPLIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL GEN
DE LA MIOSTATINA (*mstn*) DE BOVINO"**

T E S I S

QUE PRESENTA

Mónica del Rocío Gordillo Herrera

PARA OBTENER EL TÍTULO

Químico Farmacobiólogo

DIRECTOR

Dr. Marcos Cajero Juárez

Morelia, Mich. Agosto del 2006.

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



ESCUELA DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA

**"AMPLIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL GEN
DE LA MIOSTATINA (*mstn*) DE BOVINO"**

T E S I S

**QUE PRESENTA
Mónica del Rocío Gordillo Herrera**

**PARA OBTENER EL TÍTULO
Químico Farmacobiología**

**DIRECTOR
Dr. Marcos Cajero Juárez**

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Bajo la dirección del Dr. Marcos Cajero Juárez.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
◇ Ganadería en México.....	2
◇ Calidad de la carne.....	3
◇ Razas de Bovinos.....	4
◇ Razas de Calidad de Carne.....	5
◇ Razas con Mayor Musculatura.....	6
◇ Biología del Músculo.....	8
➤ Atrofia Muscular.....	11
➤ Hipertrofia Muscular.....	11
➤ Hiperplasia Muscular.....	11
◇ Características de Desarrollo Muscular.....	12
◇ Animales con fenotipo doble músculo.....	12
◇ Miostatina.....	14
JUSTIFICACION.....	17
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVO PARTICULARES.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
◇ Cultivo Primario de Epitelio Mamario de Bovino (EMB)...	19
◇ Extracción de ARN total.....	19
◇ Electroforesis.....	20
◇ Retrotranscripción de ARN (RT).....	21
◇ PCR.....	22
◇ Digestión Enzimática.....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIONES.....	34
PERSPECTIVAS.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36
ANEXO.....	40

RESUMEN

El interés de la ganadería nacional consiste en aportar a la población la proteína animal de calidad (con los aminoácidos esenciales), libre de agentes infecciosos e inocua. El consumo de carne es importante ya que aporta los requerimientos esenciales para el humano pues contiene más del 60% de proteína, aporta vitamina B12 y es la fuente principal de zinc biodisponible para el humano. La ganadería moderna integra las estrategias de reproducción, producción y mejoramiento genético de los animales, para poder satisfacer las demandas del mercado. La proteína miostatina pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento y transformación β (TGF- β). La miostatina es el regulador negativo del desarrollo de la masa muscular en los vertebrados; su alteración (mutaciones) es responsable del fenotipo de doble músculo en algunas razas de ganado bovino. El gen de la miostatina (*mstn*) se expresa en los animales adultos en el tejido adiposo, músculos esquelético y cardiaco, y en la glándula mamaria. El objetivo de este trabajo fue amplificar e identificar el gen de la miostatina a partir de cultivos celulares derivados del epitelio mamario bovino (EMB). Para lo cual se realizó la extracción del ARN total del EMB y, posteriormente mediante la técnica de RT-PCR (Retrotranscripción de la reacción en cadena polimerasa) se obtuvo el ADNc del gen *mstn*. Posteriormente se realizó la digestión enzimática con las enzimas de restricción *Hind* III y *Bgl* II, para la enzima *Hind* III no hubo corte lo cual nos indica que probablemente se tiene una mutación o se trata de una variante polimórfica dentro de la secuencia aquí reportada. El aislamiento, la identificación y el estudio del gen de la miostatina permitirá el diagnóstico molecular de sus variantes polimórficas, desarrollar anticuerpos mono- y poli-clonales, la eliminación o alteración endógena del gen en células y animales y, el estudio de los mecanismos de regulación.

INTRODUCCIÓN

La alimentación de los seres humanos es un reto importante para la producción animal ya que cada vez existe una mayor demanda de proteína de origen animal por parte de los consumidores. Por lo que los adelantos tecnológicos, farmacológicos y las mejoras genéticas buscan que la producción de alimentos sea cada vez más eficiente, dando como resultado productos de mejor calidad y en mayor cantidad. [1]

GANADERÍA EN MÉXICO.

La ganadería constantemente usa las tecnologías reproductivas, nutricionales, y farmacológicas que le permitan en menor tiempo lograr una mayor producción [1]. La principal función de la ganadería para la sociedad mexicana, consiste en dar a la población un aporte de proteína que se caracteriza por tener las concentraciones apropiadas de aquellos aminoácidos que son esenciales para el ser humano [2]. México tradicionalmente se ha caracterizado por ser un país ganadero, cuenta con grandes áreas donde se crían bovinos, ovinos, porcinos, entre otros.

El pastoreo del ganado es practicado en todos los estados de la república mexicana. Esta actividad utiliza cerca del 62.5% del total de los 2 millones de m² de tierra que existen en México. Los productores de res constituyen el segundo sector más grande en la industria ganadería en México y contribuyen con aproximadamente 40% del PIB del sector. La industria de la carne en México es la tercera más importante después de la industria de lácteos y la panificadora, dentro del sector de la comida procesada. Para el periodo entre 1988-1993, la industria ganadera logró un crecimiento anual del 29%, de los más grandes crecimientos en el sector de comida procesada. Entre los años 1990 y 1996 la producción de res aumentó a una tasa promedio anual de 4.9%, mientras que la producción de puerco y pollo incrementó en un 2.8% y 9.5% respectivamente. El consumo de la carne en México durante 1997 alcanzó los 3.78 millones de toneladas métricas, de las cuales 35% fueron res, 25% pollo, 25% puerco y el restante 2% correspondió a cabrito y cordero. [3]

Entre los productos que podemos obtener de los bovinos tenemos a la leche y sus derivados como la crema, queso y el yogurt; otro beneficio que podemos obtener de este ganado es la carne, la cuál aporta hierro, más del 60% de la proteína que requiere el humano, además contiene vitamina B12 y es la principal fuente de Zinc con mejor biodisponibilidad. [4]

CALIDAD DE LA CARNE.

La calidad de la carne está particularmente definida por su composición química (valor nutricional) y por sus características organolépticas (valor sensorial) tales como la terneza, el color, el sabor y la jugosidad. (Fig. 1)

- *Color*: Dicho atributo depende del contenido y estado de la mioglobina (principal pigmento de la carne). El contacto del oxígeno con la mioglobina forma oximioglobina otorgándole a la carne el color rojo brillante, en cambio, en ausencia de oxígeno exhibe un color rojo oscuro o púrpura (deoximioglobina). Otros factores que tienen influencia sobre el color de la carne son la edad y el porcentaje de grasa intramuscular de los animales.
- *Terneza*. Se refiere a la facilidad de corte durante la masticación. Entre los factores inherentes al animal, se encuentran el estado de las fibras musculares, la cantidad y el tipo de tejido conectivo y la cantidad de grasa intramuscular o marmoleado.
- *Jugosidad*. Es el grado de sequedad de la carne durante la masticación. Los jugos de la carne juegan un papel importante en la impresión general de la palatabilidad ya que contienen muchos de los componentes del sabor y ayudan al ablandamiento y a la fragmentación de la carne durante la masticación.
- *Aroma y sabor*. La carne cruda presenta poco aroma y sabor, y solo cuando es cocida las características organolépticas se desarrollan. En este aspecto existen componentes no específicos que derivan del calentamiento de los componentes hidrosolubles de bajo peso molecular, tales como los azúcares, aminoácidos, péptidos, nucleótidos y compuestos nitrogenados. Otros son atribuidos a la cocción de los lípidos, principalmente los fosfolípidos y en menor medida los triacilgliceroles. Sin embargo,

últimamente ha cobrado importancia el aporte de lípidos y ácidos grasos depositados en la carne (marmoleo) [4].

La calidad nutricional de la carne bovina esta determinada por el alto valor biológico de las proteínas, el gran aporte de hierro, de zinc y la incorporación de vitaminas principalmente del grupo B.



Fig. 1 Corte de carne de buena calidad.

<http://www.teorema.com.mx/images/upload/Carne-mexicana-beneficia-de.jpg>

RAZAS DE BOVINOS

Las razas de ganado bovino se clasifican en dos grupos: 1. Grupo Europeo o *Bos taurus*, y 2. Grupo Indopaquistano o *Bos indicus*.

Las razas europeas son numerosas y se distinguen claramente dos grupos, la de orientación cárnica y la de orientación lechera; además, son consideradas como las más productivas del mundo, resultado de la mayor aplicación de la ciencia y la técnica en su crianza y desde luego a una mejor alimentación y manejo. Las razas de la especie *Bos indicus* ha tenido un notable auge en países del área latinoamericana y al menos dos razas sintéticas se han generado con cruza de este grupo: a) la Brahman, y b) la Indobrasil [5-6]

RAZAS DE CALIDAD DE CARNE.

Existen varias razas que pueden producir carne de buena calidad como se muestra en la Fig.2 entre las que tenemos:

- *Aberdeen angus*. Esta raza produce carne de primera calidad, presenta un elevado porcentaje de peso en canal (en comparación con el peso vivo) y un bajo porcentaje de hueso en las piezas. Los músculos presentan una buena marmolización y las pérdidas por cocción de la carne son mínimas. La capa de grasa es más delgada que en otras razas y se distribuye mejor en el tejido muscular.
- *Hereford*. Una característica sobresaliente de los Hereford es la combinación de colores. La tonalidad del color del cuerpo va del rojo claro al rojo oscuro. El color blanco de la cara ha determinado que los ganaderos designen esta raza como “Cara Blanca”. Son animales precoces; el rendimiento de carne limpia en novillos varía entre el 60 y el 63%. En México se le localiza mayoritariamente en Sonora, Chihuahua, Durango; prácticamente no existe en el Sur del país. La asociación de criadores se ubica en Chihuahua, Chih.
- *Pie Montes*. El ganado pie montes es de huesos sólidos, constitución robusta y disposición activa; tiene una buena capacidad de crecimiento y engorda, aprovecha bien los piensos y sus canales presentan músculos de fibra fina bien marmolizada y de buen sabor. Su ritmo de crecimiento es comparable al de otras razas de abasto y puede exceder de los 600 kg a los 20 meses; el porcentaje de canal se sitúa alrededor del 53 % por animal adulto y el 65 % para animales jóvenes que pesan de 380 a 420 kg; con frecuencia el peso vivo es de 330 kg en las hembras y de 400kg en los machos al año de edad.
- *Beef Master*. Como ventajas de la raza Beef master se pueden citar las siguientes: Los animales son grandes y musculosos, resisten condiciones climáticas variadas, el índice de crecimiento es elevado, son aptos para el agostadero, presentan buen rendimiento en canal, cierta resistencia a las garrapatas y tiene una buena producción láctea.

- *Belga Azul*. El cuerpo es bastante largo, ancho y profundo y la línea ventral es casi paralela a la dorsal; las patas son fuertes, cortas y derechas, y el cuerpo está bien musculado en el dorso, lomo, grupa y muslos. Al nacer, los machos pesan 42 kg en promedio, y las hembras 40 kg. Esta raza forma un 50% de la población total de ganado bovino en Bélgica.
- *Limousine*. Los rendimientos de carne limpia varían entre el 55 y el 58 %; la carne se considera de primera categoría para el gusto francés, es de sabor agradable y bien marmoleada.
- *Charolais*. El ganado Charolais es de gran tamaño: los toros adultos pesan 900 a 1250 kg. y las vacas de 560 a 950 kg. La piel presenta pigmentación, el pelo es corto en verano y largo en invierno [5-6].

RAZAS CON MAYOR MUSCULATURA.

- *Marchigiana*. El cuerpo es voluminoso y de forma cilíndrica, de longitud mediana y línea dorsal recta. La espalda es muy musculosa, el lomo y cuartos traseros son largos; el tórax es profundo; las patas cortas con huesos y músculos fuertes. Este ganado es criado para la producción cárnica y el trabajo. El sistema más común y económico consiste en producir becerros de 14 a 16 meses de edad con un peso de 555 kg y un rendimiento en canal del 60 al 68%. El macho adulto pesa de 1 100 a 1 200 kg, y la hembra de 630 a 680 kg.
- *Romagnola*. Italia central. El tronco es rectilíneo en su perfil y cilíndrico, el tórax es profundo y los costillares bien arqueados; la espalda es musculosa, el lomo y el dorso son anchos y de mediana longitud. Los cuartos traseros son largos y amplios, pero descienden en declive desde la espina dorsal. Las patas son relativamente cortas, musculosas y de buena osamenta.
- *Simmental*. Los animales adultos alcanzan los siguientes pesos promedio: vacas 750 kg y machos hasta 1 080 kg por lo que se define como raza pesada. La altura promedio a la cruz es: machos 144 cm, hembras 138 cm [5-6].

Estas razas con mayor musculatura las podemos observar claramente en la Fig. 3

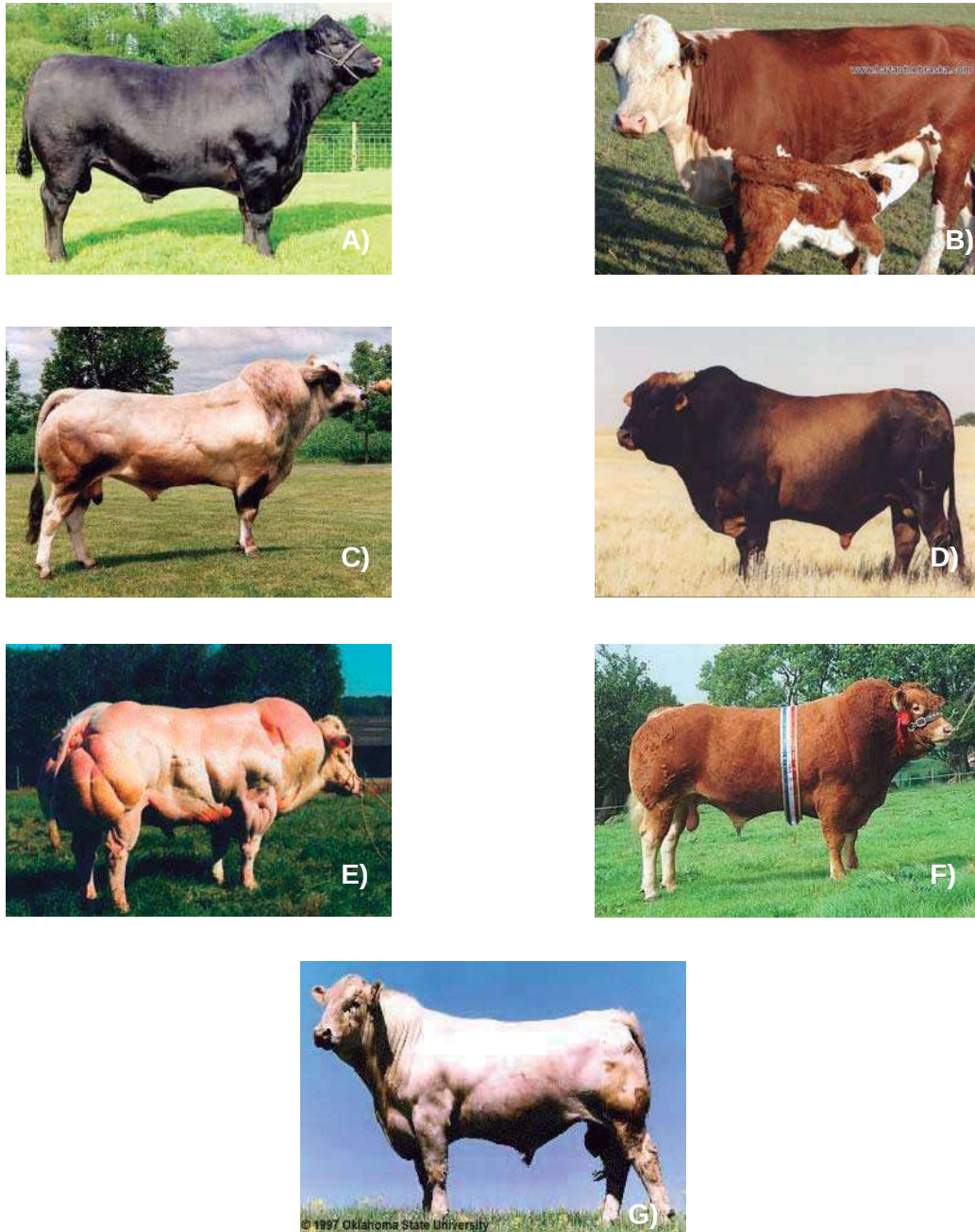


Fig. 2. Razas de calidad de carne. A) Angus. Principal productor de carne. B) Hereford. Localizado en Sonora, Chihuahua, Durango. C) Pie Montes. Rendimiento en la canal de 53-65%. D) Beef Master. Animales grandes y musculosos. E) Belga Azul. Forma el 50% de la población total en Bélgica. F) Limousine. Carne de primera categoría. G) Charolais. Animal de gran tamaño.

<http://www.veterin.unam.mx/fmvz/enlinea/bovinos/intro.html>

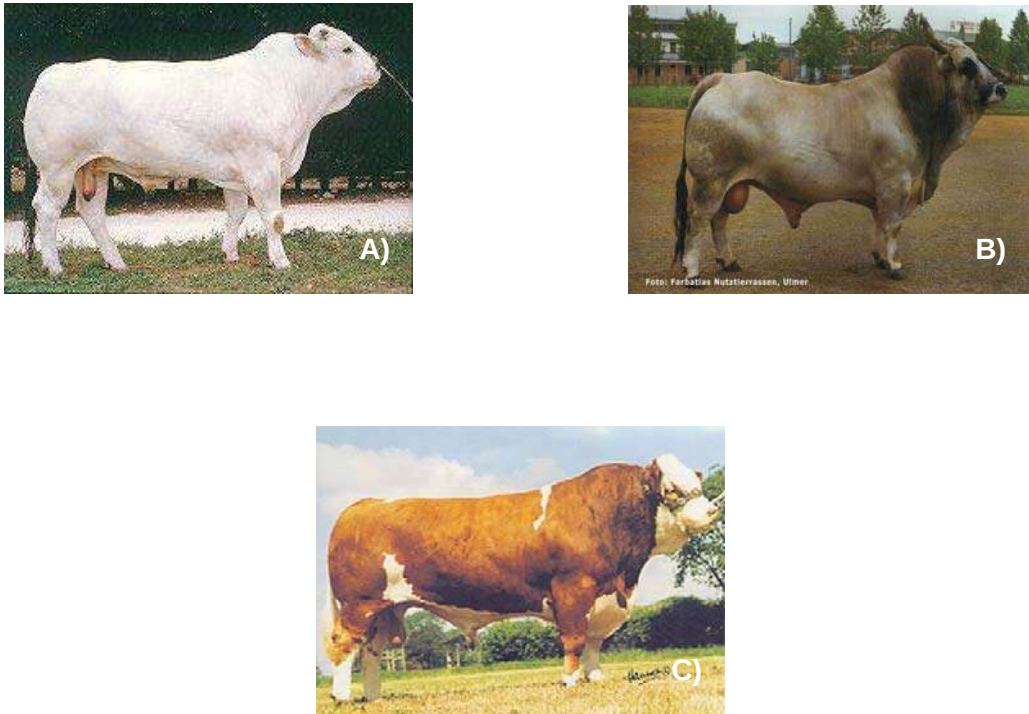


Fig. 3. Razas con mayor musculatura. A) Marchigiana. Gigante de los Bovinos y llega a pesar 1500kg. B) Romagnola. Localizado en Italia Central. C) Simmental. Se les define como raza pesada.
<http://www.veterin.unam.mx/fmvz/enlinea/bovinos/intro.html>

BIOLOGÍA DEL MÚSCULO.

El músculo esquelético debe su nombre a que casi todo este tejido se encuentra anclado a los huesos del esqueleto que desplaza. Está bajo control voluntario y la contracción se puede efectuar de manera consciente. Las células del músculo esquelético tienen estructura altamente organizada. Debido a esto, la célula muscular esquelética se denomina con mayor propiedad como fibra muscular. Su estructura se muestra en la fig. 4. [7]

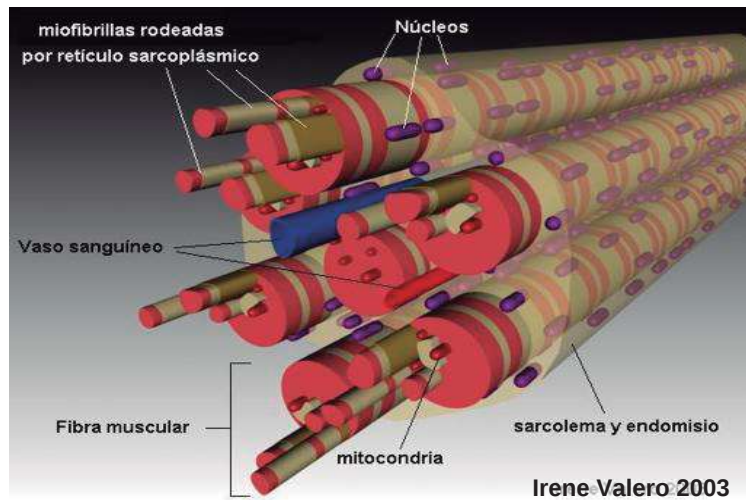


Fig. 4. Corte transversal del músculo esquelético.

La hipertrofia bovina es un síndrome que se caracteriza por un elevado desarrollo muscular en detrimento del tejido adiposo y conjuntivo. La causa genética consiste en mutaciones que afectan al gen de la miostatina, en virtud de las cuales la proteína resultante está incapacitada para la realización correcta de sus funciones biológicas. [10]

Durante el desarrollo embrionario, cada fibra muscular madura posee un centenar de núcleos o más, una vez producida la fusión pierde su capacidad para la división celular. De esta manera, el número de fibras musculares queda establecido antes del nacimiento y la mayoría de ellas permanecen toda la vida. El notable crecimiento muscular posterior al nacimiento se logra principalmente por agrandamiento de fibras existentes. Cada músculo es un órgano independiente que consta de cientos a millares de células, llamadas fibras por su forma alargada.

Unos cuantos mioblastos persisten en los músculos maduros como células satélite, estas conservan la capacidad de fusionarse entre sí o con las fibras musculares dañadas para regenerarlas. Las fibras musculares maduras se encuentran en disposición paralela una respecto de la otra y su diámetro es de 10 a 100 μm . Aunque comúnmente su longitud

es de 100 mm, algunas tienen hasta 30 cm de longitud. Los múltiples núcleos de una fibra muscular se localizan justo bajo el sarcolema, que es una vaina que envuelve al músculo dando el tono muscular. Miles de pequeñas invaginaciones del sarcolema, los túbulos transversos (túbulos T), excavan túneles desde la superficie hasta el centro de cada fibra muscular. Los túbulos T están abiertos al exterior de la fibra y se llenan de líquido extracelular. Los potenciales de acción muscular se propagan por el sarcolema y los túbulos T, los que se diseminan rápidamente en la fibra muscular. Esta estructura garantiza que el potencial de acción excite todas las partes de la fibra casi simultáneamente.

Dentro del sarcolema está el sarcoplasma, que es el citoplasma de la fibra muscular (contiene grandes cantidades de potasio, magnesio y fosfato, además de numerosas enzimas). El sarcoplasma incluye cantidades considerables de glucógeno, que se puede degradar en glucosa para su uso en la síntesis de ATP. Además, el sarcoplasma contiene mioglobina, proteína de color rojo, fijadora de oxígeno que se encuentra sólo en las fibras musculares, las moléculas de oxígeno son necesarias para la producción de ATP en las mitocondrias. Estos organelos se distribuyen en filas a través de la fibra muscular, de tal manera que se hallan estratégicamente cercanas a las proteínas musculares que usan ATP durante la contracción. Cuando se observa con amplificación el sarcoplasma, parece que estuviera lleno de pequeños filamentos. Estas estructuras diminutas son las partes contráctiles de los músculos; las miofibrillas, que tienen casi 2 μm de diámetro y se extienden a todo lo largo de la fibra muscular. Sus estrías prominentes confieren a la fibra muscular su aspecto acanalado.

Un sistema de numerosos sacos llenos de líquido, el retículo sarcoplásmico (estructura importante para producir la contracción muscular rápida), envuelve cada miofibrilla. [9] Las miofibrillas están conformadas por filamentos de miosina y de actina que interactúan para dar la contractilidad al músculo. En la fibra muscular relajada, el retículo sarcoplásmico almacena iones calcio (Ca^{+2}), que al ser liberados de las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico desencadenan la contracción muscular. [9]

El desarrollo del músculo se caracteriza por:

- ❖ **Atrofia Muscular:** Las fibras musculares disminuyen de tamaño como resultado de la pérdida progresiva de miofibrillas. La atrofia ocurre cuando no se ejercitan los músculos. En un lapso de 6 meses a 2 años, el músculo pierde tres cuartas partes de su tamaño original y el tejido conectivo fibroso sustituye a las fibras musculares. Una vez que termina esta sustitución, es imposible revertirla.
- ❖ **Hipertrofia Muscular:** Consiste en el aumento del diámetro de la fibras musculares (aumento de filamentos de actina y de miosina de cada fibra muscular) por la producción de más miofibrillas, mitocondrias, retículo sarcoplásmico, entre otros. El incremento resulta de la actividad muscular repetida que implica gran esfuerzo, como en los ejercicios con pesas. Los músculos hipertróficos poseen más miofibrillas, por lo que su contracción puede tener mayor fuerza. Con el número creciente de miofibrillas, también aumenta los sistemas enzimáticos que proporcionan energía, lo cual permite un rápido aporte de energía durante la contracción muscular intensa a corto plazo.
- ❖ **Hiperplasia Muscular:** En raras condiciones de generación de una fuerza muscular extrema, se ha observado que aumenta el número real de fibras musculares, aunque tan sólo en un pequeño porcentaje, además del proceso de hipertrofia de las fibras. Cuando se produce, el mecanismo consiste en el desdoblamiento lineal de fibras previamente aumentadas de tamaño. [8-9]

El desarrollo de músculo esquelético y la regeneración son reguladas por una variedad de factores de crecimiento y transcripción que ambos afectan la proliferación de las células tronco musculares y la diferenciación de los túbulos T. En particular, los factores de crecimiento como el TGF- β juegan un papel importante promoviendo la miogénesis.

Para estudiar el papel de la miostatina en el desarrollo de la masa muscular se generaron ratones transgénicos knock out. Los ratones que expresan la mutación del gen de la miostatina exhiben un incremento en la masa del músculo esquelético como resultado de

la extensión de hipertrofia muscular. Se observó que en ratones con una mutación negativa de miostatina presentaban efecto hipertrófico en el músculo. Interesantemente, la hipertrofia muscular fue independiente de los factores de transcripción conocidos e implicados en la hipertrofia muscular, incluyendo miogeninas como GATA-2 y MEF-2C. La miostatina es un regulador negativo de la hipertrofia muscular y esta función normal puede ser inhibida a través de un mecanismo negativo dominante. [11]

CARACTERÍSTICAS DEL DESARROLLO MUSCULAR.

El crecimiento muscular esta dado por dos factores que pueden ser de tipo patológico como la hiperplasia e hipertrofia o fisiológico que puede ser inducido por ejercicio o por el uso de algunos anabólicos que pueden ser de tipo esteroideo o no esteroideo como el Clenbuterol.

ANIMALES CON FENOTIPO DOBLE MÚSCULO.

Los animales con fenotipo “doble músculo” son aquellos que exhiben hipertrofia muscular extrema. Este tipo de conformación es una anomalía genética y se caracteriza por el abultamiento muscular exagerado de los hombros y la parte superior de los miembros posteriores, así como un trasero redondo pronunciado. Los músculos dilatados y la grasa subcutánea reducida presentan un relieve agudo a las ranuras intermusculares, y acompañado de un esqueleto de huesos afinados del animal, ofrece una apariencia escultural. La musculatura abundante es evidente en las regiones de los hombros, antebrazo, lomo, muslos y músculos de la región tibial anterior, respectivamente; y los músculos glúteos medio y vastos externo e interno, individualmente. Una vista dorsal presenta una alta proporción del ancho de la región pelviana en relación al existente en la región torácica (costillas).

Así mismo, se ha demostrado que el ganado con musculatura exagerada posee una relación músculo / hueso mayor cuando estos animales son comparados con el ganado liviano. Esta diferencia influye también en la producción de músculo libre de grasa en la canal. Cuando el peso y grado de grasa se mantienen constantes, el ganado de mayor musculatura posee mayores porcentajes de rendimiento en canal.

Según estos resultados, los animales más pesados muscularmente hablando, poseen altos porcentajes de rendimiento en canal porque sus cavidades corporales son proporcionalmente más pequeñas. Mientras que en los animales gordos resulta todo lo contrario, debido a las altas cantidades de grasa mesentéricas y a la grasa acumulada en la canal. [12]

Para aplicaciones pecuarias, el ganado doble-músculo presenta algunas desventajas, entre las cuales se encuentran la reducción de fertilidad en hembras, la baja viabilidad de progenie, y el retraso de la maduración sexual. Sin embargo, el ganado Belga Azul debido a su incremento de masa muscular, aumenta la eficiencia de alimento compensando este inconveniente. [13]

En 1997, McPherron and Lee detectaron el gen responsable de las vacas doble músculo el cual es considerado una anomalía en algunas razas de ganado. De esta manera dos razas de ganado vacuno Belga Azul y Pie Montes (Fig. 5) fueron seleccionadas mostrando un incremento en la masa muscular respecto a razas de ganado vacuno convencional. [14]

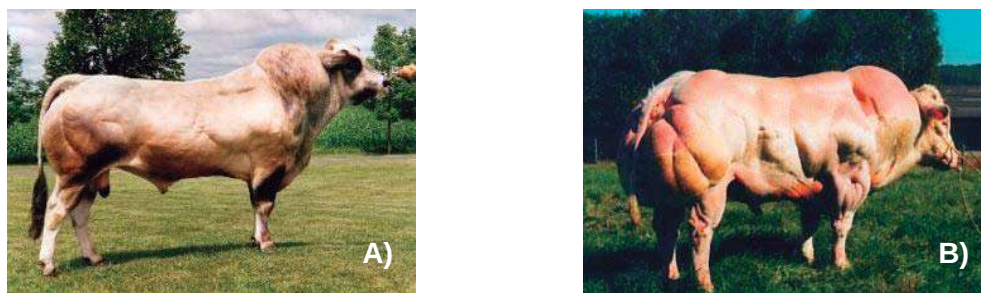


Fig. 5 Ganado vacuno. A) Pie montes. B) Belga azul.

La hipertrofia muscular conocida comúnmente como fenotipo doble músculo, ocurre en el ganado bovino Belga Azul y el Pie Montes donde las mutaciones analizadas revelaron una eliminación de 11 pb en la región que codifica el gen de la miostatina en el ganado Belga Azul produciendo una proteína truncada (no funcional). [15]

En adición, una mutación fue encontrada también en animales de la raza Pie Montes. En este caso la secuencia del gen *miostatina* contiene una mutación (un cambio amioacídico) en el exon 3, resultando en un cambio de cisteína a tirosina en la región madura de la proteína. [13-15]

MIOSTATINA.

La *miostatina* es un factor de crecimiento perteneciente a la familia de los factores de transcripción TGF- β y como todos ellos muestra una secuencia de aminoácidos característica, así como la formación de dímeros mediante puentes disulfuro, estando implicada en fenómenos de desarrollo y diferenciación celular.

La estructura en conjunto de cada miembro de la familia contiene varias características compartidas para todos los miembros de esta superfamilia. Primero, cada secuencia contiene una región central de aminoácidos hidrofóbicos cercanos al extremo amino termina; esa función es una señal de secuencia para la secreción. Segundo, cada miembro de la familia es procesado proteolíticamente. Tercero, la región C-Terminal de todos los miembros de la familia, demuestra algunos grados o categorías de homología contiene de 6 a 9 residuos de cisteína separados por espacios característicos. Y cuarto, las especies activas en cada caso aparecen como un dímero de puentes disulfuro de fragmentos de C-terminal, en muchos casos; la actividad ha sido demostrada siendo un homodímero de fragmentos C-terminales, pero los heterodímeros entre los diferentes miembros de la familia tienen también que ser detectados, y en ciertos casos, estos heterodímeros tienen que demostrar las actividades biológicas que posee para distintos homodímeros correspondientes. [18-19]

Se cree que cada miembro de la familia TGF- β es sintetizado como una pre-proteína la cual sufre un evento proteolítico en el que intervine una proteasa llamada furina realizando un corte en la secuencia de conformación RxxR (aminoácidos 263-266), aproximadamente de 110 a 114 aminoácidos para el extremo carboxilo terminal con nueve residuos de cisteína (Fig. 6). Este evento ocurre *in vivo*, [18-19] liberando un dímero proteico maduro

que es biológicamente activo, compuesto por los extremos carboxilo-terminal (C-terminal) unidos mediante un puente disulfuro.

MQKLQISVYIYLFMLIVAGPVDLNENSEQKENVEKEGLCNACLWREN
TTSSRLEAIKIQILSKLRLETAPNISKDAIRQLLPKAPLLELIDQFDVQRDASSDGS
LEDDDYHARTETVITMPTESDLLTQVEGKPKCCFFKFSSKIQYNKLVKAQLWIYL
PVKTPATVFVQILRLIKPMKDGETRYTGIRSLKLDMPGTGIWQSIDVKTVLQNLW
KQPESNLGIEIKALDENGHDLAFTFPEPGEDGLTPFLEVKVTDTPK**RSRR**DFGLD
CDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANY**CS**GE**CE**FVFLQKYPHT
HLVHQANPRGSAGP**CC**TPTKMSPINMLYFNNEGQIIYGKIPAMVVDR**CGCS**

Fig. 6. Secuencia de aminoácidos. (**M**) Metionina inicial, (**RSRR**) Corte de la enzima furina, (**C**) Residuos de cisteína, (**N**) Mutación para fenotipo doble músculo. (**S**) Último aminoácido antes de codon de paro.

Los factores de crecimiento (GF) son normalmente efectivos en concentraciones muy bajas y tienen afinidad alta por los receptores correspondientes en las células diana. Cuando el ligando se une al receptor, el complejo receptor-ligando inicia una señal intracelular (o núcleo) y modifica la expresión genética y la función de las células.

Algunos GF's estimulan la proliferación celular y otras las inhiben. Un gran grupo de GF's es la superfamilia de factor de crecimiento y transformación beta (TGF- β) del cual hay varios subtipos.

Una característica común de TGF- β 's es que son secretados por células en una forma compleja inactiva. Consecuentemente, presentan una actividad biológica latente hasta la proteína madura. El mecanismo exacto de estos complejos latentes no se entiende completamente, pero en su activación pueden involucrar la participación de enzimas como proteasas.

Otro rasgo común de los TGF- β 's es la actividad biológica, muchas veces exhibida en presencia de otros factores de crecimiento. La actividad biológica de TGF- β es compleja, ya

que dependen de un estado fisiológico de la célula diana y la presencia de otro factor de crecimiento.

Se han encontrado mutaciones (fig. 6) que alteran la estructura de la proteína miostatina, mediante la aparición de un codon sin sentido (nonsense) o bien un cambio aminoacídico (missense) que daña la formación de alguno de los puentes disulfuro necesarios para la adquisición de la estructura cuaternaria de la proteína. [10]

La miostatina se detecta a una edad temprana en los somitos (embrión) en desarrollo, y su expresión se mantiene en el animal adulto fundamentalmente en [19-20-21]:

- ❖ Glándula mamaria
- ❖ Tejido adiposo
- ❖ Músculo esquelético (Feto y adulto)
- ❖ Músculo cardíaco.

Mediante estudios moleculares, actualmente se ha reportado la presencia del gen miostatina en la mayoría de los vertebrados incluyendo gallinas, humanos, ovejas, cerdos, bovinos, entre otros. [14-16-22-23].

Para determinar el papel biológico de la miostatina en músculo esquelético, McPherron y colaboradores alteraron el gen, y la expresaron en animales transgénicos. Los fenotipos mutantes manifestaron mayor masa muscular. Todos estos ratones crecieron hasta edad adulta y luego fueron fertilizados. El ratón adulto mutante tiene una forma de cuerpo anormal con caderas y hombros muy grandes similar al ratón de tipo-silvestre. [14]

Se encontró la posibilidad emplear agentes farmacológicos capaces de bloquear la actividad de la miostatina fomentando el crecimiento muscular en humanos enfermos y también en ganado. Tanto la miostatina como los TGF existen normalmente *in vivo* en un complejo propeptídico latente (la porción de la proteína precursora) y en la activación, la miostatina puede señalar la unión para la activación de dos tipos de receptores. Tal es el caso de la activina y folistatina que son antagonistas para el gen de miostatina. [22]

JUSTIFICACION

La necesidad de incrementar la cantidad y producción de carne, que aporte proteína de buena calidad a la población nacional es imperante en los esquemas actuales de la producción animal. Como una salida alterna a lo anterior, se han diseñado e incrementado el abuso de compuestos anabólicos y esteroides para el aumento de la masa muscular animal.

Sin embargo el uso indiscriminado e irracional de estos compuestos, ha provocado graves trastornos a los animales y accidentes fatales en los seres humanos, como los casos recientemente conocidos en Jalisco, Querétaro y el Estado de México.

Una alternativa a lo anterior es el empleo de la biotecnología molecular animal, para conocer y reproducir primero en laboratorio y, después en condiciones de campo las ventajas naturales de los animales. En México, existen bovinos autóctonos los cuales están adaptados a nuestras condiciones geográficas; en estos animales es relevante analizar e identificar su mérito genético, para el aislamiento y propagación de esta particular genética animal.

Sería de interés poder identificar certeramente animales con fenotipo doble músculo autóctonos heterocigotos, los cuales serían de utilidad al tratar de evitarlos los problemas reproductivos asociados a este fenotipo. Paralelamente se impactaría de manera considerable a los sistemas de producción animal que operan a lo largo de la república mexicana.

HIPOTESIS

El gen de la miostatina se expresa en células de epitelio mamario bovino y de ellas se puede amplificar al ADNc.

OBJETIVO GENERAL

Identificación y manipulación del gen de la miostatina para su clonación molecular y producción de vectores de expresión.

OBJETIVOS PARTICULARES

Identificación y amplificación del gen de la miostatina.

Caracterización parcial por digestión enzimática del gen de la miostatina.

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVO PRIMARIO DE EPITELIO MAMARIO DE BOVINO (EMB).

El cultivo primario de EMB se cultivó en cajas petri de plástico de 10 mm (Corning), con medio F12K (Anexo 1) y 4 μ l de insulina 10 μ g/ μ l (SIGMA), en una incubadora de CO₂ (Lab-line^R, modelo 465) a 37 °C [23].

Cuando la caja llegó a una confluencia de 90-100% de células, éstas fueron cosechadas (empleando tripsina), retirado el medio se procedió a añadir 2 ml de Tripsina (SIGMA) bañando perfectamente el fondo de la caja. Terminado este proceso se llevó a la incubadora de CO₂, durante 8-10 min para que las células se despegaran perfectamente de la caja. Transcurrido este tiempo se observaron al microscopio y se recuperó la tripsina con las células en un tubo de polipropileno 15 ml (CORNING). Recuperadas las células se realizó el conteo al microscopio con el hemocitómetro (Hausser Scientific).

Criopreservación de las células de EMB.

Una vez recuperadas las células en un tubo cónico de 15 ml se llevaron a centrifugar (Centra CL2, Termo IEC) a 2,000 rpm durante 5 min. La pastilla se resuspendió con suero fetal bovino con 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO; J.T. BAKER), se resuspendió perfectamente y se alicuotó 1 ml de solución celular en criotubos (CORNING), los cuales se depositaron 2 hrs en hielo (-20°C), para transferirlos al ultracongelador (-80°C; ThermoForma. Mod. 906) por 24 hrs, para finalmente almacenarlos en nitrógeno líquido (-200°C).

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.

Se empleó la técnica de tiocianato de guanidina- fenol-cloroformo (Anexo 2).

A cajas petri a una confluencia de 100% se les retiró el medio de cultivo, se agregó 1 ml de Solución D (Anexo 2), la solución celular lisada fue recuperada un tubo de ensayo estéril. Al tubo se le incorporó 100 μ l de Acetato de Sodio (CH₃CO₂Na, J.T. BAKER) 2M a

pH 4, se agitó en vórtex (Thermolyne, Mod. M63215) durante 15 seg. Se adicionó 1ml de fenol saturado con agua (Invitrogen) con una pipeta estéril de plástico y vórtex durante 15 seg.

Se añadió 200 µl de cloroformo-isoamilalcohol (49:1), vórtex durante 1min. La solución se incubó en hielo (4 °C) por 20 min. Posteriormente se centrifugó en una microfuga (Eppendorf 5415D) a 10,000 rpm durante 20 min, se recuperó la fase acuosa en otro tubo eppendorf sin tocar la interfase, se agregó un volumen de isopropanol (J.T. BAKER), se mezcló y se llevó a 4 °C durante 1 hr.

Transcurrido ese tiempo se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min, se eliminó el sobrenadante y resuspendió la pastilla (ARN) en 200 µl de solución D; se pasó la solución a un tubo eppendorf nuevo, el cuál se precipitó con un volumen de isopropanol (400 µl) y llevó nuevamente a 4 °C durante 1 hr.

Se centrifugó a 12,000 rpm a 4 °C durante 15 min, se tiró el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70%, se resuspendió en 60 µl de agua [24] y se realizó la lectura de la Densidad Óptica (DO) al espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

ELECTROFORESIS

Se verificó la calidad del ARN en un gel de Agarosa 0.8% (Invitrogen) con solución Tris/Borato/EDTA (TBE, Anexo 3).

Previamente en la cámara de electroforesis (Owl Modelo B14) se agregó el Buffer de corrida TBE 0.5x con 5 µl de Bromuro de etidio [5 ng/ml] y se conectó a una fuente de poder (Amersham pharmacia biotech, EPS 601). Se corrió a 120 V durante 20 min y se observó a través de luz Ultravioleta.

RETROTRANSCRIPCIÓN DE ARN (RT)

Los retrovirus (RV) han mostrado peculiaridades biológicas que les hacen muy diferentes de los otros grupos de virus y que han dado lugar a la reinterpretación de algunos dogmas de la biología en vigor hasta hace bien poco. La propiedad más característica de este grupo de virus es la retrotranscripción, descubierta en 1970 por Baltimore. Este proceso consiste en la síntesis de una molécula de ADN utilizando como patrón un ARN, y es una actividad enzimática que no existe en las células normalmente. La observación de este fenómeno obligó a modificar el dogma central de la biología molecular acerca del sentido del flujo de la información genética ADN- ARN- proteína. [25]

En tubos de plástico para PCR se preparó una solución utilizando 2 μ l de Buffer de transcriptasa inversa (New England,), 1 μ l de inhibidor de RNasa (RNasin), 1 μ l de oligonucleótido dT [50 μ M], 1 μ l Transcriptsa inversa (200,000 U/ml, New England) utilizado como molde 1 μ g de ARN de EMB para obtener el ADNc ,1 μ l dNTPs, y aforar a 20 μ l con agua destilada.

Una vez realizada la solución se dejó 10 min a temperatura ambiente, después se llevó a un Termociclador (Applied Biosystems Gene Amp^R. PCR Systems 2700), el cual debe de estar programado de la siguiente manera:

40 °C	94 °C	6 °C
50 min	4 min	4 min

Tabla 2. Programa con temperaturas y tiempos para RT

Una vez terminada esta reacción se obtuvo el ADNc que se utilizó para realizar una PCR.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Esta técnica se utiliza para la síntesis “*in vitro*” de secuencias específicas de ADN. La técnica se basa en la replicación del DNA realizada por la ADN polimerasa. Esta enzima realiza la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5’-3’ usando un molde de cadena sencilla e iniciadores. Los iniciadores son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 5’ y 3’ del fragmento de ADN que se desea amplificar.

Partiendo de este principio, la PCR se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas.

1. Desnaturalización del ADN doble cadena. En esta etapa la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97 °C).
2. Hibridación de los iniciadores a la zona específica de cada una de las hebras. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (50-65 °C).
3. Extensión del cebador por actuación de la ADN polimerasa (Elongación). Se produce el fragmento de doble cadena por la complementariedad en dirección 5’-3’ mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos presentes en el medio siguiendo la cadena molde.

Componentes de PCR.

- ❖ Muestra de ADN. Cantidad suficiente para la amplificación del ADN en forma única.
- ❖ ADN polimerasa: Taq polimerasa, ésta es una enzima termoestable aislada de *Termus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas.
- ❖ Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs): dATP, dGTP, dCTP, dTTP.
- ❖ Amortiguador de la reacción. El uso de adyuvantes elevará la especificidad y fidelidad de la PCR.

- ❖ Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$). La concentración de este ión resulta fundamental para la optimización de la reacción. En concentraciones altas de magnesio disminuye la especificidad y en bajas concentraciones aumenta.
- ❖ Temperaturas y tiempo de los ciclos. Cada ciclo esta compuesto de las tres etapas (Desnaturalización, hibridación y elongación). El tiempo, la temperatura y el número de ciclos son factores determinantes en los resultados de la PCR, por lo tanto al modificarlos se optimiza la reacción. [26]

Secuencia de Oligonucleótidos.

- Miostatina 3' : 5'- TCA TGA GCA CCC ACA GCG -3'
- Miostatina 5' : 5'- CAT GCA AAA ACT GCA AAT CTC -3'
- β -Actina 3' : 5'- TCG TAC TCC TGC TTG CTG A -3'
- β -Actina 5' : 5'- ATG GTG GGA ATG GGT CAG AA -3' [27]

Se realizó una solución en tubo de plástico eppendorf (1.5 ml) con los siguientes componentes: 10 μ l de dNTPs, 10 μ l amortiguador (Biotechnológicas universitarias), 5 μ l $MgCl_2$ (Biotechnológicas universitarias), 0.5 μ l Taq Polimerasa (Amplificasa, biotechnológicas universitarias), 2 μ l miostatina 3', 2 μ l miostatina 5', 2 μ l cDNA y aforar a 100 μ l. (Anexo 4)

En el caso del control positivo se cambiaron los oligonucleótidos de miostatina por los oligonucleótidos de β -actina y se utilizaron los mismos reactivos con sus respectivas cantidades. [27-28]. Elaborada la solución se llevó a un Termociclador programando como se indica en la Tabla 3.

94 °C	94 °C	56 °C	72 °C	72 °C	6 °C
1 min	30 seg	1min	1:20min	10 min	Infinito

Tabla 3. Programa para realizar PCR utilizando 45 ciclos

Terminada la reacción se procedió a realizar una electroforesis, la cual se corrió a 120V durante 40min. Utilizando marcador lambda *BstE* II (New England).

Transcurrido el tiempo se retira de la cámara y se observa a través de luz Ultravioleta. Se realizó la comparación del gen obtenido con el marcador, tomando en cuenta el número de pares bases del gen de la Miostatina el cual tiene 1128 pb.

DIGESTION ENZIMATICA.

Obtenida la banda del gen MSTN se realizaron tres cortes enzimáticos utilizando el equivalente a 20 ng de ADN por cada reacción. Se elaboró un primer corte el cual se realizó con la enzima *Bgl* II (GIBCO), un segundo corte con la enzima *Hind* III (New England) y un último corte utilizando las dos enzimas anteriormente mencionadas realizando así una doble digestión, la cuál se realizó en dos pasos debido a la incompatibilidad de las enzimas.

Se agregó en un tubo eppendorf (1.5 ml) 0.5 µl enzima *Bgl* II (Gibco BRL®), 1 µl buffer Reactor # 3 (Gibco BRL®), 1 µl del gen de la miostatina y 7.5 µl de agua. En otro tubo se colocó 0.5 µl de *Hind* III (New England), 1 µl buffer 2 (New England), 1 µl de gen de la miostatina y 7.5 µl de agua y se llevaron a Baño María (Shel-Lab, Model 1202) a 37 °C durante 35 min. Transcurrido el tiempo se realizó una electroforesis y se observó a través de luz Ultravioleta, utilizando como referencia un marcador λ100 pb (New Englad).

Y en un tercer tubo se realizó la doble digestión enzimática utilizando 0.5 µl enzima *Bgl* II, 1 µl su buffer Reactor # 3, 1 µl del gen de la miostatina y 7.5 µl de agua y se llevó a Baño María a 37 °C durante 35 min, una vez terminado el tiempo se sacó el tercer tubo utilizado para la doble digestión y se le realizó una limpieza agregando un volumen de fenol-cloroformo, se agitó con vórtex y llevó a centrifugar durante 5 min a 12,000 rpm.

Terminado el proceso se tomó la fase acuosa y se recuperó en un tubo nuevo, a esta fase se le adicionó 10 % de NaCl 2M, 1 µl de glicógeno [50 mg/µl] y se homogenizó, después

se incorporó un volumen de isopropanol y nuevamente se homogenizó, llevó al ultracongelador a -80 °C (ThermoForma, Mod. 1545) durante 25 min, centrifugar a 12,000 rpm durante 10 min, tirar el sobrenadante y lavar la pastilla con etanol al 70 % frío. Dejar secar las paredes y resuspender con 7.5 µl de agua, 0.5 µl *Hind* III, 1 µl de gen MSTN y nuevamente se llevó a baño maría durante 35 min. Concluidos los dos cortes enzimáticos se realizó electroforesis y se observa a través de luz ultravioleta utilizando marcador λ 100.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CULTIVO CELULAR

La línea celular de epitelio mamario bovino (EMB) se mantuvo *in vitro* empleando el estímulo hormonal correspondiente de hidrocortisona e insulina. Las células a una confluencia de 90-100 % fueron cosechadas, sembradas o empleadas para el aislamiento de macromoléculas (ADN, ARN y proteínas). Las células aisladas en cultivo necesitan las hormonas arriba señaladas para mantener su estado diferenciado y paralelamente estimulen su proliferación *in vitro* [29].

El cultivo de epitelio mamario bovino *in vitro* se duplica cada 24 hrs, lo cual corresponde al tiempo de proliferación reportado para este tipo celular [23]. Se mantiene durante 10 pasajes lo cual corresponde aproximadamente 20 ciclos celulares según lo reportado [30].

Este cultivo primario fue donado por el laboratorio de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa del CMEB-UMSNH. Las células de epitelio mamario bovino cultivadas de manera *in vitro* forman una monocapa con una morfología de tipo “domo” (Fig. 7), la cual presenta uniones estrechas entre las células así como una gran cantidad de microvellosidades, vacuolas de grasa y vesículas secretoras correspondientes a este tipo celular *in vivo* [31-32].

La caracterización del cultivo consistió en la inmunocitoquímica para determinar el origen epitelial del cultivo, mediante la detección de la expresión de la proteína citoqueratina. Con el empleo de la PCR se verificó la expresión de los genes de las proteínas lácteas de caseína-beta y caseína - kappa cuya expresión específica es del epitelio mamario [33].

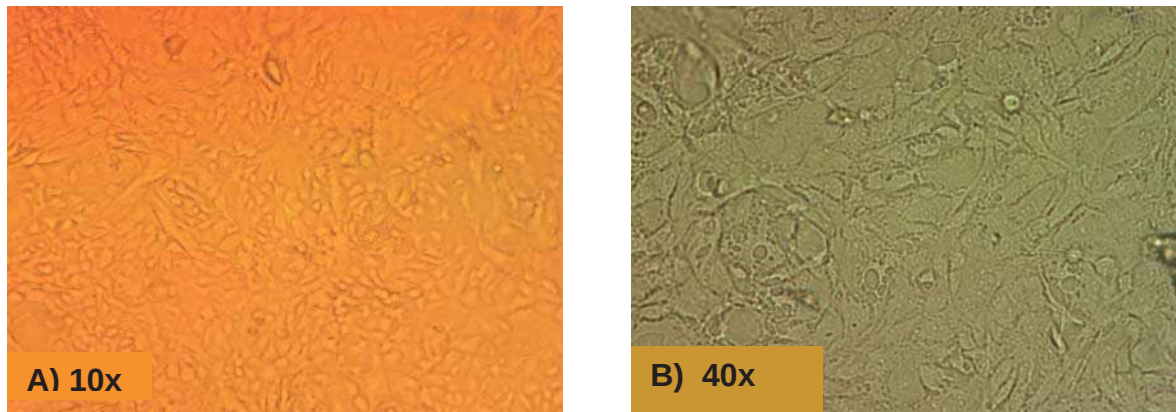


Fig 7. Epitelio mamario de bovino. A y B cultivos *in vitro* formando una monocapa con una morfología celular de tipo “domo”

Estos resultados garantizaron que el cultivo primario utilizado en este trabajo fue un epitelio mamario bovino en forma pura.

IDENTIFICACIÓN DEL GEN DE LA MSTN

A partir del cultivo de epitelio mamario bovino se realizó el aislamiento del ARN total, ya que este tejido así como el cardiocito, el miocito y el adipocito se han reportado expresan al gen de la miostatina [21-22]. Este gen molecularmente alterado (mutado) se expresa en el ganado bovino de fenotipo de doble músculo, así como en su forma silvestre en los animales con fenotipo normal.

El resultado de la técnica utilizada tiocinato de guanidina-fenol-cloroformo, para la extracción de ARN total se puede observar claramente en la figura 8, el ARN esta libre de ADN contaminante, se obtuvo la molécula en buena cantidad e importantemente, éste ARN no fue degradado durante su extracción y/o manipulación. Este ARN purificado está compuesto por 90 % de ARN ribosomal y solo el 10 % corresponde al ARN mensajero.

Una muestra del ARN [3 µg] fue sometida a electroforesis en gel de agarosa, la cual presentó las tres bandas características de ARN ribosomal 28S, 18S, 5S (Fig. 8) que se presenta en las células eucariotas, lo cual coincide a lo reportado en la literatura [23].

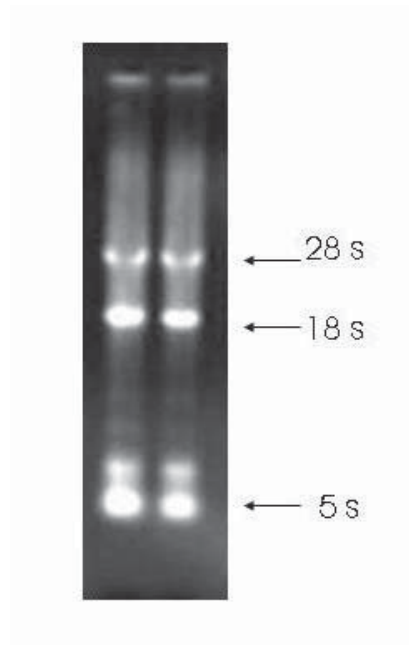


Fig. 8 ARN total de epitelio mamario de bovino. Teñido con bromuro de etidio. Gel de agarosa al 0.8%.

Se realizó la técnica de RT utilizando como molde de la reacción enzimática ARN total [1 µg], el cual contiene moléculas de ARNm que en sus extremos 3' presentan colas de poli-A. Siguiendo las reglas de Watson/Crick el oligoprimero-T se unió al extremo de poli-A, para lograr el copiado de las cadenas de ADNc correspondientes a todos los genes que codifican proteínas celulares, incluido el gen de la *mstn*.

Este ADNc posteriormente fue amplificado por medio de la PCR para obtener la banda de ADN correspondiente al gen de β -actina y de la miostatina.

Utilizando al gen β -actina como control positivo ya que éste gen forma parte de la estructura celular eucariota, además de ser un gen constitutivo, el cual presenta una banda aproximadamente de 876 pb [27]. De manera independiente se realizó la PCR del gen de la miostatina ya que ambos genes (β -actina y *mstn*) tiene un peso molecular muy semejante y al realizar una sola reacción para estos dos genes no podríamos observar de manera clara sus bandas. (Fig. 9).

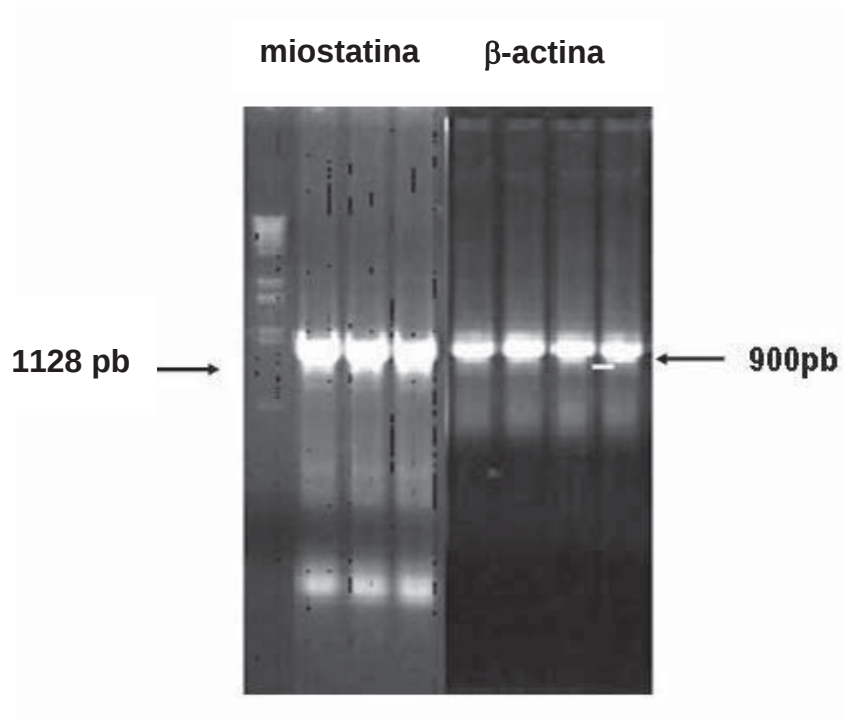


Fig. 9. PCR del ADNc de epitelio mamario bovino. El gen de la miostatina de 1128 pb, el gen β -actina de 876 pb. M marcador de peso molecular λ BstE II. Gel de agarosa al 0.8%.

También se utilizó como control negativo de la PCR al ARN total obtenido el cual en este caso no amplificó ninguna secuencia (resultado no mostrado), este resultado indicó que el aislamiento del ARN fue libre de ADN contaminante. Si en esta reacción se hubiera amplificado alguna banda de ADN la conclusión sería que el ARN se encontraba contaminado. A este respecto se sabe que la técnica de PCR solo amplifica ADN y no ARN como templado de la reacción de síntesis.

A través de electroforesis observamos por medio de luz ultravioleta una banda de ADN de aproximadamente 1128 pb (Fig.10), que corresponden al gen de la miostatina completo, dado que los oligonucleótidos fueron diseñados para incluir el triplete de iniciación AUG y el de terminación del gen [14].

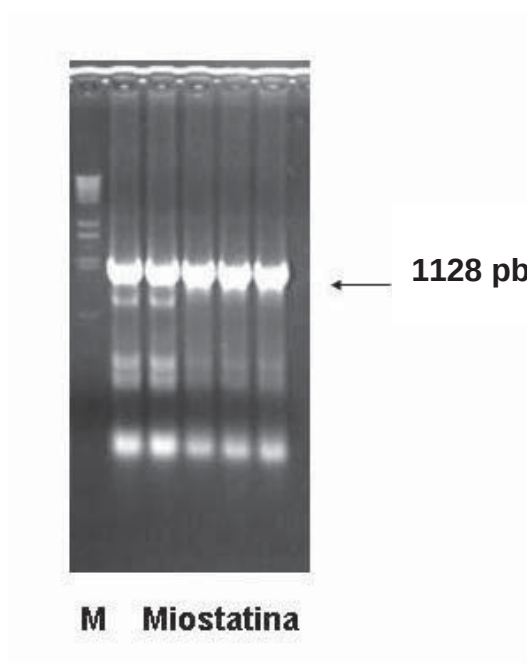


Fig. 10 PCR del gen *mstn*. El gen *mstn* que codifica para la proteína miostatina fue amplificado en gran cantidad. M marcador de peso molecular lambda *BstE* II. Gel de agarosa al 0.8%.

DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DEL GEN *MSTN*.

Se realizaron cortes enzimáticos con el objetivo de comprobar que la banda amplificada por PCR efectivamente era el gen de la miostatina que se estaba buscando. Con la banda de ADN de 1128 pb se realizó una digestión enzimática de acuerdo con el patrón de digestión de la secuencia reportada en la base de datos, obteniendo el corte correcto (2 bandas) con la enzima *Bgl* II con un peso molecular aproximado de 421 pb y 778 pb.

Paralelamente se realizó la digestión enzimática con las enzimas *Hind* III la cual produce 3 bandas con pesos moleculares de 189 pb, 251 pb, 674 pb. La doble digestión enzimática del gen *mstn* produce 4 bandas con pesos moleculares de 85 pb, 104 pb, 251 pb, 674 pb.

```

agat tca ctg gtg tgg caa gtt gtc tct cag act ggg cag gca tta acg 49
ttt ggc ttg gcg tta ctc aaa agc aaa aga aaa gta aaa gga aga agt 97
aag aac aag gga aaa gat tgt att gat ttt aaa acc atg caa aaa ctg 145
                                     M   Q   K   L
caa atc tct gtt tat att tac cta ttt atg ctg att gtt gct ggc cca 193
Q   I   S   V   Y   I   Y   L   F   M   L   I   V   A   G   P
gtg gat ctg aat gag aac agc gag cag aag gaa aat gtg gaa aaa gag 241
V   D   L   N   E   N   S   E   Q   K   E   N   V   E   K   E
ggg ctg tgt aat gca tgt ttg tgg agg gaa aac act aca tcc tca aga 289
G   L   C   N   A   C   L   W   R   E   N   T   T   S   S   R
cta gaa gcc ata aaa atc caa atc ctc agt aaa ctt cgc ctg gaa aca 337
L   E   A   I   K   I   Q   I   L   S   K   L   R   L   E   T
gct cct aac atc agc aaa gat gct atc aga caa ctt ttg ccc aag gct 385
A   P   N   I   S   K   D   A   I   R   Q   L   L   P   K   A
cct cca ctc ctg gaa ctg att gat cag ttc gat gtc cag aga gat gcc 433
P   P   L   L   E   L   I   D   Q   F   D   V   Q   R   D   A
agc agt gac ggc tcc ttg gaa gac gat gac tac cac gcc agg acg gaa 481
S   S   D   G   S   L   E   D   D   D   Y   H   A   R   T   E
acg gtc att acc atg ccc acg gag tct gat ctt cta acg caa gtg gaa 529
T   V   I   T   M   P   T   E   S   D   L   L   T   Q   V   E
gga aaa ccc aaa tgt tgt ttc ttt aaa ttt agc tct aag ata caa tac 577
G   K   P   K   C   C   F   F   K   F   S   S   K   I   Q   Y
aat aaa cta gta aag gcc caa ctg tgg ata tat ctg agg cct gtc aag 625
N   K   L   V   K   A   Q   L   W   I   Y   L   R   P   V   K
act cct gcg aca gtg ttt gtg caa atc ctg aga ctc atc aaa ccc atg 673
T   P   A   T   V   F   V   Q   I   L   R   L   I   K   P   M
aaa gac ggt aca agg tat act gga atc cga tct ctg aaa ctt gac atg 721
K   D   G   T   R   Y   T   G   I   R   S   L   K   L   D   M
aac cca ggc act ggt att tgg cag agc att gat gtg aag aca gtg ttg 769
N   P   G   T   G   I   W   Q   S   I   D   V   K   T   V   L
cag aac tgg ctc aaa caa cct gaa tcc aac tta ggc att gaa atc aaa 817
Q   N   W   L   K   Q   P   E   S   N   L   G   I   E   I   K

```

```

gct tta gat gag aat ggc cat gat ctt gct gta acc ttc cca gaa cca 865
A L D E N G H D L A V T F P E P
gga gaa gat gga ctg act cct ttt tta gaa gtc aag gta aca gac aca 913
G E D G L T P F L E V K V T D T
cca aaa aga tct agg aga gat ttt ggg ctt gat tgt gat gaa cac tcc 961
P K R S R R D F G L D C D E H S
aca gaa tct cga tgc tgt cgt tac cct cta act gtg gat ttt gaa gct 1009
T E S R C C R Y P L T V D F E A
ttt gga tgg gat tgg att att gca cct aaa aga tat aag gcc aat tac 1057
F G W D W I I A P K R Y K A N Y
tgc tct gga gaa tgt gaa ttt gta ttt ttg caa aag tat cct cat acc 1105
C S G E C E F V F L Q K Y P H T
cat ctt gtg cac caa gca aac ccc aga ggt tca gcc ggc ccc_tgc tgt 1153
H L V H Q A N P R G S A G P C C
act cct aca aag atg tct cca att aat atg cta tat ttt aat ggc gaa 1201
T P T K M S P I N M L Y F N G E
gga caa ata ata tac ggg aag att cca gcc atg gta gta gat cgc tgt 1249
G Q I I Y G K I P A M V V D R C
ggg tgt tca tga ggt cta tat ttg gtt cat agc ttc ctc aaa cat gga 1297
G C S
agg tct tcc cct caa caa ttt tga aac tgt gaa att atg tac cac agg 1345
cta taa gcc tag agt atg cta cag tca ctt aag cac aag cta cag tat 1393
atg agc taa aaa gag aga ata tat gca atg gtt ggc att taa cca ..... 2581

```

Fig. 11. Secuencia de ARNm de *Bos Taurus*. (Verde) Secuencia no codificante, (Azul) Caja tata, (Violeta) Codon de inicio de la transcripción, (Rojo) Secuencia codificante 1128 pb, (Negro) Secuencia de 375 aminoácidos en código de una letra, (Lavanda) Sitio de corte de enzima furina. () Oligoprimers del gen MSTN, (Verde oscuro) Codon de paro, (Café) Sitio de corte para *Bgl* II, (Azul cielo) Sitio de corte para *Hind* III.

Se obtuvo el corte enzimático correcto con *Bgl* II como ya se ha mencionado el cual se puede observar claramente en el carril 3, lo cual indicó que la secuencia del gen *mstn* amplificada y reportada en este trabajo (Fig. 12). Para el caso de la enzima *Hind* III no se obtuvo el corte enzimático reportado, probablemente debido a que ésta secuencia de ADN puede presentar en este sitio una mutación de la secuencia genética, provocada por la enzima Taq DNA polimerasa empleada, o bien sea el resultado de una variante polimórfica, lo cual explicaría de manera satisfactoria el resultado encontrado como se muestra en el carril 2 en el cual se encuentra una sola banda de ADN que no fue cortada. En el carril 4 se encuentra la doble digestión y se puede observar solamente el corte realizado por la enzima *Bgl* II.

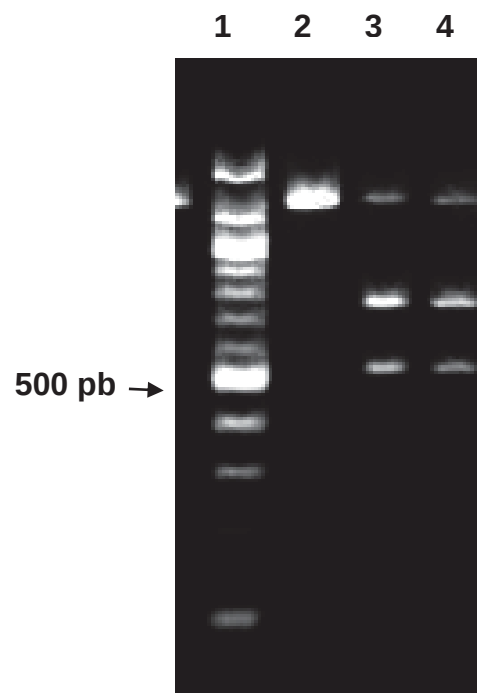


Fig. 12 Digestión enzimática del gen *mstn*. Corte con las enzimas *Hind* III (carril 2), con *Bgl* II (carril 3) y doble corte con *Hind* III y *Bgl* II (carril 3). M marcador de peso molecular de 100 pb. Gel de agarosa al 1.5%.

CONCLUSIONES

El epitelio mamario bovino *in vitro* expresa al gen que codifica para la proteína miostatina.

Se amplificó e identificó el gen de la miostatina (*mstn*) por medio de RT-PCR, obteniendo una banda de DNA de 1128pb.

La caracterización por digestión enzimática parcial indica que el fragmento amplificado tiene un sitio de corte para la enzima *Bgl* II. La enzima *Hind* III no cortó el gen *mstn*, dado que probablemente se tiene una mutación o una variación polimorfica.

PERSPECTIVAS

Con el gen *mstn* amplificado éste puede ser clonado y secuenciado para poder certificar la identidad del gen.

Así como llevar a cabo el desarrollo de anticuerpos mono y policlonales, la eliminación o alteración endógena del gen *mstn* en células y animales, el estudio de los mecanismos de regulación.

También se podrá realizar la identificación de animales homocigotos y heterocigotos, además de inducir el fenotipo doble músculo en animales de granja y la realización de sistemas biológicos inducidos.

BIBLIOGRAFIA

1. <http://www.monografias.com/trabajos15/badrenergicos/βadrenergicos.shtml>
2. Soto Izquierdo, E., De Haro Duarte, A., Frish Guajardo, U., Ruiz Barra, J., 1988, "Panorama de la ganadería mexicana", 19-29pp.
3. <http://www.conagro.com/novedades/ganaderia.html>
4. <http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/carne/depetris.htm>
5. <http://www.veterin.unam.mx/fmvz/enlinea/bovinos/intro.html>
6. López Zavala, R. 2003. Razas de Bovinos productores de carne. 1ed, Ed. Departamento editorial de la Universidad de Tamaulipas. México 3-80p.
7. Karp, G. 2001. Biología Celular y Molecular. 3ed, Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, México. 361-379p.
8. Tortora y Grabowski. 2002. Principios de Anatomía y Fisiología. 9ed, Ed. OXFORD, México. 273-301p.
9. Guyton, A.C. y Hall, J.E. 2001. Tratado de Fisiología Médica, 10ed, Ed. Mc Graw-Hill, México 79-93p.
10. Miranda, M.E., Cañón, J., Ménissier F.M Hanset, R., Williams, J. Dunner, S., 2001 Identificación de los distintos halotipos del gen de la miostatina en razas bovinas europeas. IX Jornadas sobre producción animal, AIDA Zaragoza. ITEA 22:39-41.

11. Zhu, X., Hadhazy, M., Wehling, M.G., Tidball, J.M., McNally, E., 2000; Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. FEBS Letters 474, 71-75p.
12. <http://www.pcca.com.ve/vb/articulos/ub46p24.html>
13. McPherron, A.C., Lee, S-J., 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene, Proc Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 94, 12457-12461p.
14. Volk, E., The Myostatin Gene. 1997. Montana Range Brand. 1-8p.
15. Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P.L., and Bass, J.J., 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in Double-muscled Belgian Blue and Piedmontese Cattle Genome Research. 7:910-915p.
16. McPherron, A. and Lee, S.J. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. PANAS 9306-9311p.
17. McFarlane, C., Langley, B., Thomas, M. Hennebry, A., Plumier, E., Nicholas, G., McMahon, C., Sharma, M., Kambadur, R. 2005. Proteolytic processing of myostatin is auto-regulated during myogenesis. Developmental Biology 283:58-69p.
18. Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M. Kirk, S., Bass, J., Kambadur, R. 2001. Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by Inhibiting Myoblast Proliferation. The Journal of Biological Chemistry. Vol 275(51) 40235-40243p.
19. McPherron, A. and Lee, S.J.; 1996. The Transforming Growth Factor β Superfamily. In Growth Factors and Cytokines in Health and Disease. Vol. 1B:357-393p.
20. Grobet, L., Poncelet, D., Royo, L.J., Brouwers, B., Pirottin, D., Michaux, C., Menissier, F., Zanotti, M., Dunner, S., Georges, M. 1998. Molecular definition of an allelic series

- of mutations disrupting the myostatin function and causing doble-muscling in cattle. *Mammalian Genome* 9:210-213.
21. Royo, L.J., Grobet, L., Poncelet, D., Pirottin, D., Marot, V., Brouwers, B., Dunner, S., Georges, M. 2001. Identificación de regiones reguladoras del gen de la miostatina. Sección de mejoramiento genético CENSYRA-SERIDA-somío. *ITEA* 22:36-38.
22. Yang, J., Ratovitski, T., Brady, J.P., Solomon, M.B., Wells, K.D. and Wall, R.J. 2001. Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice. *Molecular Reproduction and Development*. 60:351-361.
23. German, T. and Barash, I. 2002. Characterization of an epithelial cell line from bovine mammary gland. *In Vitro Cellular and Development Biology*; 38:282-292.
24. Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-Step Method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*. 162:156-159.
25. <http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/Dibulgeneral/LosVirus/Retrovirus.htm>
26. www.monografias.com/trabajos11/tamau/tamau.shtml#
27. Torner L., Nava, G., Dueñas, Z., Corbacho, A., Mejía, S., López, F., Cajero, M., Martínez de la Escalera, G. and Clapp, C. 1999. Changes in the expression of neurohypophyseal prolactins during the estrous cycle and after estrogen treatment. *Journal of Endocrinology*. Vol 161:423-432.
28. Mathews, C.K. and Van Holde, K.E. 2001. *Bioquímica. Proteínas en movimiento: Sistemas contráctil y de motiladas*. 2ed. Ed McGraw Hill-Interamericana, Madrid. 293p.

29. Gordon, K.E., Binas, B., Chapman, R.S., Kurian, K.M., Clarkson, R.W.E., Clark, A.J., Lane, E.B., Watson, C.J, 2000. A novel cell culture model for studying differentiation and apoptosis in the mouse mammary gland. *Breast cancer research*, 2:22-235.
30. Rose, M.T., Aso, H., Yonekura, S., Komatsu, T., Hagino, A., Ozutsumi, K. and Obara, Y. 2002. *In vitro* differentiation of a cloned bovine mammary epithelial cell. *Journal of Dairy Research*. 69:345-355.
31. Cifian, E., Guidry, A.J., O'Brien, C.N., Nickerson, S.C. and Marquardt, W.W. 1994. Adherence of *Staphylococcus aureus* to Cultured Bovine Mammary Epithelial Cells. *J Dairy Sci* 77:970-983.
32. Zavizion, B., Gorewit, R.C. and Politis, I. 1995. Subcloning the MAC-T Bovine Mammary Epithelial Cell Line: Morphology, Growth Properties, and Cytogenetic Analysis of Clonal Cells. *J Dairy Science*, 78:515-527.
33. Anaya, J.L., Contreras, O.E., Cábarez, A., Baizabal, V.M., López, J.E., Valdéz, J.J., Ochoa A. 2006. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *ELSEVIER*.

ANEXOS

Anexo 1.

CULTIVO PRIMARIO DE EPITELIO MAMARIO DE BOVINO (EMB).

- Medio F12K (Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nutrient Mixture F-12 Ham). Añadir 10% de Suero Fetal Bovino (GIBCO), 5 ml de Penicilina-Streptomicina (GIBCO) y filtrar con membranas 0.22 μ m (Millipore) estériles.

Anexo 2.

EXTRACCIÓN DE RNA.

1. Extracción	Solución D, 0.2M de acetato de sodio, pH 4, fenol-cloroformo.
2. Precipitación	Un volumen de isopropanol
3. Reprecipitación	Solución D, un volumen de isopropanol
4. Lavado	Etanol 70%
5. Solubilización	Agua destilada.

Pasos para realizar extracción de ARN total.

- Solución D. Tiocianato de guanidina 4M, Cirato de Sodio 25 mM pH 7, Sarcosyl 0.5% y β -Mercaptoetanol (SIGMA) 100 mM.

Anexo 3.

ELECTROFORESIS.

- TBE (Tris/borato/EDTA) Electroforesis Buffer. 10x. Tris base (SIGMA) 108 g, Ácido Bórico (J.T. BAKER) 55g, 40 ml EDTA 0.5m (pH 8), Aforar con agua destilada a 1 L.
- Buffer de Carga Azul.- 0.25% Bromofenol Azul, 0.25% Xylen Cianol FF, 30% glicerol en agua.

Anexo 4.

PCR

- dNTPs [25pM/μl] (Invitrogen).
20μl de cada uno + 920μl Agua destilada.
- Oligonucleótido Miostatina 3' (66.666 pM/μl)
37.5μl Stoke + 62.5μl agua destilada (25 pM/μl)
- Oligonucleótido Miostatina 5' (60.606 pM/μl)
41.25μl Stoke + 58.8μl agua destilada (25 pM/μl)